

甘草酸人工抗原的合成鉴定及免疫原性分析

蔡碧双, 邵幼岩, 林纪昀, 徐金森

(厦门大学 生命科学学院 细胞生物学与肿瘤细胞工程教育部重点实验室, 福建 厦门 361005)

摘要:目的 制备中药甘草的活性成分甘草酸(GA)的人工抗原及抗血清,为制备GA的单克隆抗体,并建立快速检测GA的酶联免疫吸附测定(ELISA)提供技术基础。方法 将GA与载体蛋白牛血清白蛋白(BSA)偶联起来制成完全抗原后,经基质辅助激光解吸飞行时间质谱鉴定其相对分子质量,用此抗原免疫BALB/c小鼠,制备抗血清,并通过间接ELISA法和竞争ELISA法检测其抗体效价和特异性。结果 合成的人工抗原GA-BSA中GA与BSA的结合比约为7:1;免疫小鼠得到特异针对GA的多抗血清,GA抗体的效价为1:8 000。结论 成功地合成了GA的人工抗原,且该抗原有良好的免疫原性,可应用于建立GA的免疫分析方法。

关键词: 甘草酸; 基质辅助激光解吸飞行时间质谱; 酶联免疫吸附测定

中图分类号: R392.1 文献标识码: A 文章编号: 1005-1678(2008)01-0019-04

Identification and immunogenicity analysis of artificial antigen of Glycyrrhizic acid conjugated with BSA

CAI Bi-shuang, SHAO You-yan, LIN Ji-yun, XU Jin-sen

(Key Laboratory of the Ministry of Education for Cell Biology and Tumor Cell Engineering, School of Life Sciences, Xiamen University, Xiamen 361005, China)

Abstract: Purpose To prepare the conjugate antigen Glycyrrhizic acid - bovine serum albumin (GA-BSA) and its antiserum to produce anti-GA monoclonal antibody and to establish a fast assay for GA content by an ELISA. **Methods** The conjugate antigen GA-BSA was artificially coupled and identified by matrix-assisted laser absorption ionization time-of-flight mass spectrometry (MALDI-TOF-MS). BALB/c mice were immunized with GA-BSA to prepare antiserum against GA. The antiserum titer and specificity were detected by indirect ELISA and competitive ELISA, respectively. **Results** The conjugating ratio of GA and carrier BSA was 7:1. The antiserum titer was 1:8 000 and it reacted specifically to the GA. **Conclusion** The successfully synthesized conjugate antigen GA-BSA implies its feasibility in the establishment of fast immunoassay for the GA content determination

Key words: Glycyrrhizic acid; MALDI-TOF-MS; ELISA

甘草酸(Glycyrrhizic acid, GA)是一种五环三萜类化合物,分为 α 、 β 两种异构体,其化学结构式如图1所示。它是豆科植物甘草最主要的药理活性物质,具有抗炎、抗病毒、增强免疫、抗癌等功能^[1]。近年来国内外大量研究显示它还具备保肝解毒功能:蔡瑜等^[2]发现GA可抑制相关信号的传导,从而减

少肝纤维化的发展;Okamoto等^[3-4]的研究表明它可以有效地防治Fas、Con A介导的肝损伤。此外,在与抗生素、纤维素、生物碱类生成复盐后,某些甘草酸盐类可以增强药理作用或者提高活性,某些可以降低毒副作用。

GA是甘草药用成分的定量指标,目前检测GA的常用方法有紫外分光光度法(UV)、高效液相色谱法(HPLC)、毛细管电泳法(HPCE)、薄层扫描法(TLCS)等^[5],但这些方法或者操作复杂,灵敏度低,或者分析成本高,耗时长。基于抗原抗体反应的酶联免疫检测(ELISA)是1种新型的分析方法,可以有效解决传统方法所存在的问题。要建立ELISA,首

收稿日期: 2007-09-10

基金项目: 国家自然科学基金资助(No. 30572316)

作者简介: 蔡碧双(1983-),女,福建晋江人,在读硕士生, E-mail: cshxmu@hotmail.com; 徐金森,通信作者, Tel: 0592-2184083, E-mail: jsxu@xmu.edu.cn.

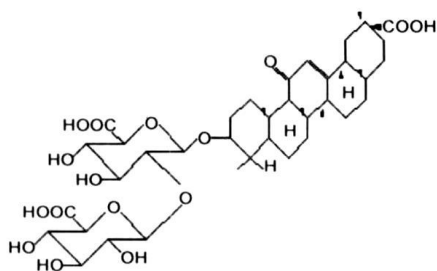


图 1 甘草酸的化学结构式

Fig 1 Chemical structure of Glycyrrhizic acid

先要得到抗 GA 的抗体,但 GA 相对分子质量 (M_r) 较小,难于直接用于免疫操作,必须和大分子的载体蛋白如牛血清白蛋白(BSA),人血清白蛋白(HSA)等偶联之后构成完全人工抗原才能应用于免疫操作。本研究以 BSA 为载体合成 GA-BSA,经基质辅助激光解吸飞行时间质谱(MALDI-TOF-MS)鉴定其 M_r 后免疫小鼠,用 ELISA 分析血清中抗体的特异性和滴度。为制备 GA 的单克隆抗体及建立快速检测 GA 的 ELISA 奠定了基础。

1 材料

GA(含量为 98%,HPLC 归一法),上海融禾医药科技有限公司;BSA、卵清白蛋白(OVA),弗式完全佐剂(FCA)、弗式不完全佐剂(FICA),Sigma 公司;羊抗鼠酶标抗体、2,2'-氨基-双(3-乙基-苯并噻唑啉-6-磺酸)铵盐(ABTS)显色剂,美国 Pierce 公司;甲醇、 NaIO_4 、三氟乙酸(TFA)、乙腈、芥子酸,均为分析纯。

自动多功能酶标仪、自动洗板机,上海科华实验系统有限公司;MALDI-TOF-MS,美国布鲁克·道尔顿有限公司。

BALB/c 小鼠,3 只,SPF 级,6 周龄,体重 16~18 g,雌性,厦门大学抗癌研究中心提供,动物合格证号:SCXK(闽)2004-0001。

2 方法

2.1 GA-BSA 人工抗原的合成

GA-BSA 人工抗原的合成方法参照文献[6]并稍加修改:将 GA 的甲醇溶液(GA 10.4 mg 溶于甲醇 0.54 mL)逐滴加入 NaIO_4 溶液内(NaIO_4 10 mg 溶于水 0.8 mL),搅拌 1 h 后,再慢慢加入含有 BSA 的 50 mmol/L(pH 9.6)的碳酸缓冲液(BSA 10 mg 溶于碳酸缓冲液 2.8 mL),用 1 mol/L 的 NaCO_3 调整反应混合液的 pH 值至 9.0,于室温下搅拌 6 h 后,将反应液对蒸馏水透析 3 d,再经冻干处理,即得到 GA-BSA 复合物。

2.2 MALDI-TOF-MS 测定 GA-BSA 的 M_r

供试品处理:称取 GA-BSA 0.6 mg,溶于 8 mol/L

的尿素 30 μL 中,然后将它稀释成适当的浓度。称取 BSA 1 mg 溶于水 50 μL 中。

基质辅助溶液的配制:将 0.15% TFA 34 μL 加到乙腈 17 μL 中,再加入适量的芥子酸使溶液达到过饱和状态,超声 15 min,1 000 r/min 离心 3 min,备用。

MALDI-TOF-MS 测定:各取供试品和基质辅助溶液 1 μL ,充分混匀,吸取混合液 1 μL 滴加在金属点样板上,室温凉干后,上 MALDI-TOF-MS 测定。

MALDI-TOF-MS 的仪器工作条件为: N_2 激光 337 nm,4 次/s 脉冲,加速电压 20 KV,真空度 5×10^{-8} mbar,真空管长度为 1.5 m,线性模式下操作,所得数据用 Bruket XMASS 软件分析。

2.3 GA-BSA 人工抗原的免疫原性鉴定

2.3.1 抗血清的制备 本实验共免疫 3 只 BALB/c 小鼠,免疫用的 GA-BSA 人工抗原溶于 pH 7.4,磷酸盐缓冲液(PBS)中,浓度为 1 mg/mL。

免疫程序:首次免疫取 0.2 mL 溶有 GA-BSA 的 PBS 与等量完全弗式佐剂混合,每只 BALB/c 小鼠皮下多点注射混合液 0.1 mL;两周后,取含有 GA-BSA 的 PBS 0.15 mL 与等量的弗式不完全佐剂混合,每只小鼠按混合液 0.08 mL 加强免疫;以后每隔两周用同样的方法加强免疫,共加强免疫 3 次。第 3 次加强免疫 1 周后眼球采血,将所采得的血液于 37 $^{\circ}\text{C}$ 放置 2 h 后,于 8 000 r/min 离心 5 min,取上清液备用。

2.3.2 间接 ELISA 法测定抗体效价 该测定所用的包被抗原为 GA-OVA,其合成方法与 2.1 项基本相同,仅反应 pH 值为 10.0。

用碳酸缓冲液将 GA-OVA 配成浓度为 4 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 的溶液,以 100 $\mu\text{L}/$ 孔包被 96 孔板,37 $^{\circ}\text{C}$ 孵育 1 h;用 5% 脱脂奶粉于 37 $^{\circ}\text{C}$ 封闭 2 h;加入从 1:500 开始倍比稀释的抗血清(PBS 稀释)100 $\mu\text{L}/$ 孔,37 $^{\circ}\text{C}$ 孵育 1 h;加入羊抗鼠酶标抗体(1:2 000 稀释)100 $\mu\text{L}/$ 孔,37 $^{\circ}\text{C}$ 孵育 1 h,显色液用 ABTS,100 $\mu\text{L}/$ 孔,于 37 $^{\circ}\text{C}$ 反应 30 min,在波长 405 nm 处,用酶标仪读出各孔的 A 值。阴性对照用未免疫过的小鼠血清,空白对照为 PBS。每一稀释比的供试品设置 3 个平行孔。

血清供试品的 $A_{405\text{nm}}$ 值(P)除以阴性对照的 $A_{405\text{nm}}$ 值(N)大于 2 的即为阳性,反之则为阴性,以 P/N 大于 2 的血清最高稀释倍数作为抗体的效价。

2.3.4 竞争 ELISA 法检测抗体特异性 选取血清效价最高的 BALB/c 小鼠进行测定。以间接 ELISA 测得的 $A_{405\text{nm}}$ 在 1.0 左右的血清稀释度作为工作浓度。用 10% 甲醇将 GA 稀释为 0.000 7,0.007,0.07,

0.7 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 竞争浓度。酶标板经 4 $\mu\text{g}/\text{mL}$ GA-OVA 包被, 5% 脱脂奶粉封闭后, 加入不同浓度的竞争 GA 溶液, 抗血清各 50 μL , 混匀后于 37 $^{\circ}\text{C}$ 孵育 1 h。其余步骤同 2.3.2。空白对照为 10% 甲醇 50 μL 加 PBS 50 μL 。依据 $A_{405\text{nm}}$ 的变化判断是否发生竞争反应。

3 结果

3.1 GA-BSA 人工抗原的合成产率

冻干后的供试品为 12.5 mg, 而反应物 GA 和 BSA 总共有 20.4 mg, 由此可计算出产物和反应物的质量比约为 61.27%, 这一结果优于本实验室之前制得的芍药苷-人血清白蛋白复合物 (PF-HSA) 的产率 (50%)^[7]。虽然在透析过程中未偶联上去的小分子等可能造成质量损失, 这一结果仍可满足后续的 M_r 鉴定、免疫操作和测试等需要。

3.2 GA-BSA 人工抗原的 MALDI-TOF-MS 鉴定

图 2 和图 3 分别为 BSA 和 GA-BSA 的质谱图。可 BSA 的 M_r 为 66 189, GA-BSA 的 M_r 为 71 698, 已知 GA 的 M_r 是 823, 该结果表明 GA-BSA 中, 每个载体蛋白 BSA 分子上偶联有 7 个 $[(71\ 698 - 66\ 189) / 823 \approx 7]$ GA 分子, 人工抗原合成成功, 可用于免疫小鼠, 制备相应的抗血清。

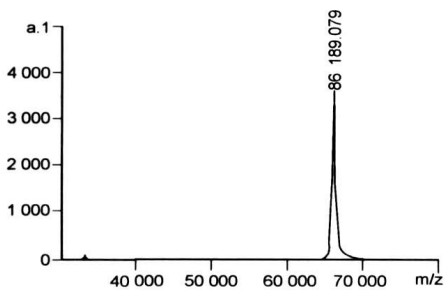


图 2 BSA 的 MALDI-TOF-MS 图谱

Fig 2 MALDI-TOF-MS spectrum of BSA

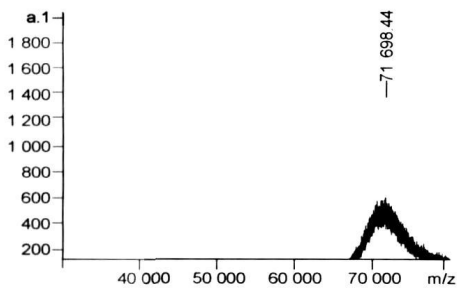


图 3 GA-BSA 复合物的 MALDI-TOF-MS 图谱

Fig 3 MALDI-TOF-MS spectrum of the antigen conjugates GA-BSA

3.3 抗血清的效价及特异性分析

3 份抗血清由于小鼠的个体差异, 效价各不相同, 其中 3 号小鼠的抗体效价最高, 扣除空白后其血清稀释倍数与相应的 $A_{405\text{nm}}$ 值, P/N 值如表 1 所示,

当 P/N 值 > 2 时, 认为结果为阳性, 由此可知, 抗血清效价为 1: 8 000。

表 1 间接 ELISA 测定抗血清效价

Tab 1 Antiserum titer detected by indirect ELISA

抗血清稀释倍数	$A_{405\text{nm}}$	P/N
1/ 500	2. 722	26. 173
1/ 1 000	1. 870	17. 981
1/ 2 000	1. 007	9. 683
1/ 4 000	0. 442	4. 25
1/ 8 000	0. 214	2. 098
1/ 16 000	0. 033	0. 317
阴性对照	0. 104	—

血清稀释 2 000 倍时, 间接 ELISA 测得的 $A_{405\text{nm}}$ 为 1.007, 以此稀释度的血清作为竞争 ELISA 的工作浓度。GA 对 GA-OVA 与抗血清结合的竞争结果如图 4 所示。竞争 ELISA 结果显示 $A_{405\text{nm}}$ 随着 GA 竞争浓度的增加而减少, 说明小鼠的抗血清具有 GA 特异性。

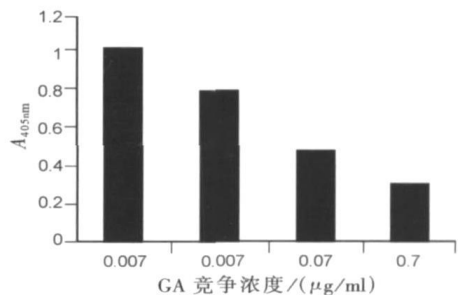


图 4 竞争 ELISA 检测抗血清的特异性

Fig 4 Antiserum specificity detected by competitive ELISA

由间接及竞争 ELISA 法结果可知抗血清的抗体水平较高, 特异性较好。从而说明了本实验合成的人工抗原 GA-BSA 具有良好的免疫原性, 可作为 ELISA 及单抗制备的免疫原。

4 讨论

作为一个完全抗原必须同时具备 T 细胞和 B 细胞表位。小分子物质由于分子太小一般难以同时拥有 2 个表位, 必须将其连接到一些大分子蛋白载体以形成偶联物, 借助大分子 T 细胞表位间接诱导 B 细胞激活、分化增殖, 产生针对半抗原的特异性抗体^[8]。GA 是一种羧基半抗原, 对于羧基半抗原与载体的偶联, 传统的人工抗原的合成方法有混合酸酐法、活泼酯法及碳二亚胺法。本实验采用 Erlanger 和 Beiser 改良法, 合成的 GA-BSA 中半抗原与载体蛋白的结合比高于之前李刚等^[9]用碳二亚胺法合成的 GA-SBA (5:1)。因此, 本实验的合成效率较高, 合成方法简便可行, 可为其他小分子物质的人工抗原合成提供参考。

然而,连接过多的半抗原,并不意味着实际的免疫效果就一定好,半抗原与载体的偶联比存在着最佳范围。因此有必要对制得的人工抗原进行免疫原性分析。本实验采用间接 ELISA 测得抗血清效价为 1:8 000,竞争 ELISA 结果显示抗血清的特异性显著。证明了本实验合成的人工抗原 GA-BSA 有较好的免疫原性,可为 GA 的单克隆抗体的研制,ELISA 的建立提供技术基础。

此外,本实验采用 MALDI-TOF-MS 测定人工抗原 GA-BSA 的 M_r ,与传统的鉴定方法(紫外光谱扫描法、标记抗原示踪法和凝胶电泳等)相比,该技术具有高灵敏度,供试品消耗量低,结果直观、准确(误差小于 0.2%)等优点,近年来已被广泛应用于生物大分子的鉴定^[10],是比较理想的鉴定分析方法。

参考文献:

- [1] 史桂兰,胡志浩.甘草酸药理作用及临床应用研究进展[J].天津药学,2001,13(1):10-12.
- [2] 蔡瑜,沈锡中,王吉耀.甘草酸对大鼠肝纤维化过程中肝组织基

因表达的影响[J].中华医学杂志,2003,83(13):1122-1125.

- [3] Okamoto T, Tanaka N, Vulto A G, et al. The protective effect of Glycyrrhizin on anti-fas antibody - induced hepatitis in mice[J]. Eur J Pharmacol, 2000, 387(2): 229-32.
- [4] Okamoto T, Kanda T, Vulto A G, et al. Glycyrrhizin protects mice from concanavalin A-induced hepatitis without affecting cytokine expression[J]. Int J Mol Med, 1999, 4(2): 149-152.
- [5] 程晓霞,向瑛.甘草及其制剂中甘草酸的定量方法研究概况[J].时珍国医国药,2000,11(4):380-381.
- [6] Erlanger B F, Beiser S M. Antibodies specific for ribonucleosides and ribonucleotides and their reaction with DNA[J]. Proc Natl Acad Sci USA, 1964, 52: 68-74.
- [7] 徐金森. MALDI-TOF-MS 法测定芍药苷-人血清白蛋白复合物的半抗原数[J].厦门大学学报(自然科学版),2006,45(增刊):54-56.
- [8] 陈继明,龚晓明,陆承平. T 细胞表位研究进展[J].中华微生物学与免疫学杂志,1998,18(1):78-82.
- [9] 李刚,赵静,王保民,等.甘草有效成分甘草酸人工抗原的光谱鉴定研究[J].特产研究,2005,1(2):17-18.
- [10] 刘益华,徐俊福.基质辅助激光解吸飞行时间质谱在生物大分子中的应用[J].中国生化药物杂志,2004,25(3):192-193.

(上接第 18 页)

分别为 2.93 和 5.16 g/L,底物转化率分别为 53.2% 和 93.6%。

4 结论

最佳的固定化条件为:3%海藻酸钠,0.1 mol/L CaCl₂,固定化 6 h。IGAD 最适 pH 为 5.0,最适温度为 42℃,最适底物浓度为 1%,在反应进行 4 次时,有一半酶活性丧失。反应 2 h IGAD 的转化效率在 90%以上。经固定化的 GAD 酶活约为原粗酶液中 GAD 的一半,但机械性强,可回收并反复利用,因此可用于生产 GABA。

参考文献:

- [1] 杨藻宸.药理学和药物治疗学(上册)[M].2000 版.北京:人民卫生出版社,2000:487-503.
- [2] Otomo E, Araki G, Mori A, et al. Clinical evaluation of GABA in the

treatment of cerebrovascular disorders[J]. Arzneimittelforsch, 1981, 31(9):1511-1523.

- [3] Defeudis F V. γ -Aminobutyric acid and cardiovascular function[J]. Experientia, 1983, 39: 845-848.
- [4] 化学化工大辞典编委会.化学化工大辞典[M].北京:科学技术出版社,2003:1143.
- [5] 许建军,江波,许时婴.生物合成 γ -氨基丁酸的乳酸菌的筛选[J].食品技术,2002,10:7-10.
- [6] Pbkhov A Y, Gusyatiner M M, Yampolskaya T A, et al. Preparation of γ -aminobutyric acid using *E. coli* cells with high activity of glutamate decarboxylase[J]. Appl Biochem Biotechnol, 2000, 88: 257-265.
- [7] 张龙翔,张庭芳,李令媛.生化实验方法和技术[M].1997 版.北京:高等教育出版社,1997:138-140.
- [8] 刘清,姚惠源,张晖.生成 γ -氨基丁酸乳酸菌的选育及发酵条件优化[J].氨基酸和生物资源,2004,26(1):40-43.
- [9] 杨晓玲,赵宗云,刘永军,等.应用纸层析分离鉴定氨基酸方法的改进[J].植物生理学通讯,2002,38(4):368.