

文章编号:1673-1689(2006)02-0017-03

## 抗黄精皂苷多克隆抗体的制备

齐斌, 谷文英

(江南大学食品学院, 江苏无锡 214036)

**摘要:** 首先将薯蓣皂苷通过3-羟基位的改造, 制成3-琥珀酰薯蓣皂苷, 再通过碳二亚胺将其与牛血清白蛋白和卵清蛋白偶联制成免疫原和包被原, 免疫新西兰大白兔制备出多克隆抗体, 抗体效价为1:12800, 为进一步建立黄精皂苷ELISA方法打下基础。

**关键词:** 黄精皂苷; 薯蓣皂苷; 多克隆抗体; 制备

**中图分类号:** Q 78

**文献标识码:** A

### Preparation of Multiclonal Antibody of Anti-*P. sibiricum*redoute Saponins

QI Bin, GU Wen-ying

(School of Food Science and Technology, Southern Yangtze University, Wuxi 214036, China)

**Abstract:** The diosgenin was firstly modified into the diosgenin-3-succinate at its hydroxyl position. Then the diosgenin-3-succinate was conjugated with bovine serum albumin (BSA) and the egg albumin (OVA), respectively. The diosgenin-3-succinate and the BSA conjugate was used as the immunogen. The diosgenin-3-succinate and OVA conjugate was used as the antigen. White rabbits was immunized with the immunogen. The high titer(1:12800) multiclonal anti-diosgenin antisera was obtained. This study provided the basis for the establishing of the ELISA of *P. sibiricum* Redoute saponins.

**Key words:** *P. sibiricum*redoute saponins; diosgenin; multiclonal antibody; preparation

黄精皂苷是黄精中的重要生理活性物质, 其检测方法多用以薯蓣皂苷为标准品的比色法, 影响因素较多。由于薯蓣皂苷是小分子物质, 为半抗原, 不能够直接作为免疫原注射动物使之产生抗体, 需连接到蛋白质等大分子上才具有免疫原性。本研究的目的是以薯蓣皂苷-牛血清白蛋白为免疫原免疫新西兰大白兔, 利用产生的多克隆抗体建立间接ELISA方法, 来探讨定量检测黄精皂苷含量的可行性。

### 1 试验材料

#### 1.1 试剂

薯蓣皂苷(Diosgenin 简称DIO, Sigma公司产品)、N-羟基琥珀酰亚胺(NHS, Mercker公司产品)、水溶性碳化二亚胺(EDC, Sigma-Aldrich公司产品)、琥珀酸酐(上海化学试剂厂产品)、二甲基甲酰胺(DMF, Sigma公司进口分装)、四甲基联苯胺(TMB, Sigma公司产品)、辣根过氧化物酶标记

收稿日期:2005-03-08; 修回日期:2005-05-10.

基金项目:国家自然科学基金项目(30471155).

作者简介:齐斌(1965-),男,吉林长春人,教授,工学博士.

羊抗兔 IgG(珠海百奥生物技术有限公司产品)、卵清蛋白(OVA, Sigma 公司进口分装,相对分子质量 45 000)、牛血清蛋白(BSA, Sigma 公司进口分装,相对分子质量 67 000)、弗氏完全佐剂(FCA, Sigma 公司产品)、弗氏不完全佐剂(FICA, Sigma 公司产品),磷酸盐缓冲液(PBS:氯化钠 8.0 g,氯化钾 0.2 g,磷酸氢二钠 2.9 g,磷酸二氢钾 0.2 g,加蒸馏水定容至 1 L),其它试剂均为国产分析纯。

### 1.2 试验动物

新西兰大白兔 2 只,江苏省农业科学院实验动物中心提供,许可证 scxk(苏)2002-0025。

### 1.3 仪器设备

Agilent 1100 LC/MSD 四级杆液质联用仪,紫外-可见分光光度计(Perkin Elmer Lambda25),酶标板(96 孔, CORNING),酶标仪(LABSYSTEM),洗板机(LABSYSTEM),移液器(Jencons Seal-pette)等。

## 2 试验方法

### 2.1 半抗原的合成

将 4-二甲基吡啶(0.027 32 g)和琥珀酸酐(0.425 05 g)溶于 10 mL 无水吡啶中,再加入薯蓣皂苷(0.046 03 g),于 55 °C 水浴回流反应 48 h,用 20 mL 水终止反应,再加入 25 mL 二氯甲烷萃取 3 次。将有机层合并后分别用 25 mL 1%醋酸和 25 mL 水各洗涤 3 次,减压浓缩近干,再将残余物溶于甲醇,产物直接用于薄层层析、液质联用仪分析鉴定<sup>[1]</sup>。

### 2.2 人工抗原的合成

用活泼酯法合成免疫原及包被抗原。将(36.1 μmol)半抗原,EDC(35.9 μmol),NHIS(79.9 μmol)加入 1 mL 无水 DMF,4 °C 保存 24 h。为了增加半抗原在水相中的溶解度,向 DMF 中加入 2 mL 的二氧六环后,再加入含有 16 mg BSA 溶液(用 0.1 mol/L 的 Na<sub>2</sub>CO<sub>3</sub> 溶液配制),4 °C 搅拌 24 h。反应结束后,在 1 L 0.15 mol/L NaCl 溶液中充分透析 72 h。蛋白透析溶液用 0.15 mol/L NaCl 稀释,调整其最终质量浓度为 1 mg/mL,分装后于 -20 °C 保存。包被抗原的制作方法与免疫原相同,载体蛋白使用卵清蛋白(OVA)。利用紫外吸收法对半抗原及载体蛋白偶联结果进行鉴定<sup>[2,7]</sup>。

### 2.3 抗体的制备

用合成的 DIO-BSA 作为免疫原。选取 2 只 1.5~2.0 kg 的纯种雄性新西兰大白兔作为试验动物,试验前一周采集阴性血清<sup>[3-4]</sup>。

具体免疫程序如下:

1) 首次免疫采用每只 1 mg 免疫原与等体积弗氏完全佐剂混和,乳化成油包水结构后进行背部皮下多点注射(40 点左右)。

2) 3 周后用同样剂量的免疫原与等体积不完全弗氏佐剂进行加强。

3) 此后每隔两周加强一次。

4) 第 4 次开始,每次免疫 1 周后,兔耳缘静脉采少量血,分离血清,以阴性血清作对照,采用 IC-ELISA 法测定抗体效价,效价达  $2 \times 10^4$  后,进行最后一次免疫。

5) 最后一次用加倍量抗原的生理盐水稀释液直接耳缘静脉注射,1 周后心脏采血,将采集的血液先于室温下静置,待血球凝集后转入 37 °C 烘箱中放置 1 h,再转入 4 °C 冰箱内,24 h 后离心取上清。添加终质量浓度为 0.01 g/dL 的硫柳汞,分装后于 -20 °C 冻存。

### 2.4 抗体的纯化

采用硫酸铵二步沉淀法<sup>[5]</sup>纯化抗体。取 10 mL 上清液与等量的生理盐水混合,边搅拌边逐滴加到 10 mL 饱和硫酸铵溶液中,4 °C 过夜,使其充分沉淀。3 000 r/min 离心 20 min,弃上清液,以生理盐水溶解沉淀并定容至 10 mL,再逐滴加到 5 mL 饱和硫酸铵溶液中,4 °C 过夜。重复第二步 1 次。将末次离心后所得沉淀物以 PBS 溶解并定容至 10 mL,装入透析袋。在 4 °C 1 L PBS 中透析 72 h(换液 4 次),取透析袋内样品作适当稀释后,紫外扫描测蛋白含量。最后制成冻干粉,于 -20 °C 保存备用。

### 2.5 抗体效价的测定

间接非竞争 ELISA 法测定抗体效价,用方阵滴定法确定抗体及包被抗原的工作浓度<sup>[12]</sup>。选择 OD 值为 1.0 时的抗原抗体稀释浓度作为抗原抗体最佳工作浓度。

## 3 结果与分析

### 3.1 半抗原的鉴定

薯蓣皂苷琥珀酸半抗原的合成见图 1,薯蓣皂苷琥珀酸半抗原的 TLC 鉴定见图 2。

薯蓣皂苷作为一种小分子物质,必须经过结构改造后与大分子载体蛋白结合才具有免疫原性。小分子物质对抗体的特异性取决于免疫原的结构,国内外很多学者对薯蓣皂苷的结构改造进行尝试。Manju Sarkar 等<sup>[6]</sup>建立了薯蓣皂苷的均相酶免疫测定,Darcy R. Driedger<sup>[1]</sup>制作了薯蓣皂苷的抗体。

作者的实验结果与文献报道相符。从 TLC 上可以看出,薯蓣皂苷(DIO)与琥珀酸酐反应形成 DIO-3-琥珀酸半酯,连接上羧基后导致极性下降,致使物质极性增大,在正相硅胶板上保留值大,斑点出现

在距原点较近位置。且带有羧基基团的物质在展层的过程中容易解离,导致斑点呈弧形,出现拖尾现象。

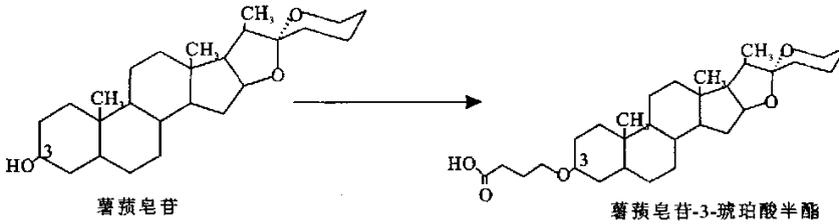


图 1 薯蓣皂苷琥珀酸半抗原的合成示意图

Fig. 1 Sketch mapping of synthesis of the diosgenin-3-succinate

注:A,薯蓣皂苷;B:薯蓣皂苷琥珀酸半酯(改造的半抗原);展开剂为V(氯仿):V(甲醇)=9:1上行展开,浓硫酸喷雾显色

图 2 薯蓣皂苷半抗原改造 TLC 分析

Fig. 2 TLC analysis of diosgenin-3-succinate

3.2 人工抗原的鉴定

薯蓣皂苷-3-琥珀酸酐和牛血清白蛋白及卵清蛋白的偶联紫外扫描图谱分别见图 3,4。

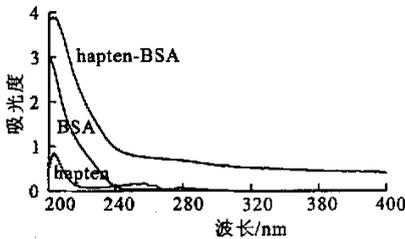


图 3 DIO-BSA 紫外扫描图谱

Fig. 3 Ultraviolet scan of DIO-BSA

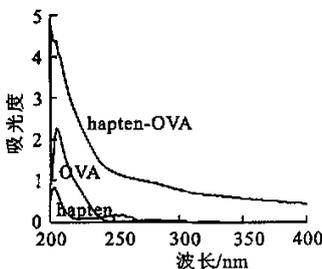


图 4 DIO-OVA 紫外扫描图谱

Fig. 4 Ultraviolet scan of DIO-OVA

从图 3,4 可以看出:采用紫外可见分光光度计对半抗原、偶联物及蛋白质进行紫外全波长扫描,半抗原在 260 nm 附近有吸收峰,半抗原-蛋白质偶联物在同样位置有突起,偶联物在 280~260 nm 吸收曲线有上扬趋势,可能是由于 BSA 结合上半抗原后吸收峰出现叠加引起,由此推断半抗原与蛋白质偶联成功。再经最终的动物免疫证明合成偶联物有良好的免疫原性。

3.3 抗体效价的测定结果

取 2 只兔子的阴性血清作 ELISA 分析,OD<sub>450</sub> 接近 0,表明兔子体内不存在半抗原对应的抗体,2 只兔子均可用于制备抗体的免疫动物。经过多次加强免疫后,取血清测效价,其中以 A471 号兔子产生的抗体效价最高,为 12 800,另一只效价较低,说明免疫动物个体之间在应答方面存在差异。

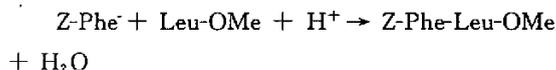
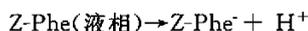
以大于阴性血清吸光度值 2.1 倍计(P/N ≥ 2.1),两只新西兰大白兔的抗血清效价(以 2 μg/mL DIO-OVA 作为包被原)分别为 1:5600,1:12800,选择效价最高的 A471 血清建立 ELISA 方法,其优化的工作质量浓度为包被抗原 2 μg/mL,抗体稀释度为 1:10000。

在最佳工作质量浓度条件下测定不同质量浓度薯蓣皂苷对抗原抗体结合的标准抑制曲线,所制备的多克隆抗体能较好地识别薯蓣皂苷,其标准曲线在 5.105 × 10<sup>-3</sup> ~ 3.972 × 10<sup>-1</sup> μg/mL 线性范围内呈相关性,回归方程 A = 32.021 lg c + 189.02,相关系数 R<sup>2</sup> = 0.997 4,最低检测下限 I<sub>10</sub> 为 2.468 × 10<sup>-3</sup> μg/mL。

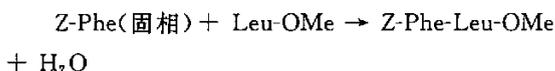
4 结 论

将小分子的薯蓣皂苷进行琥珀酐改造,制备的 3-琥珀酐薯蓣皂苷作为半抗原,通过 EDC 偶联到牛血清白蛋白和卵清蛋白上, (下转第 23 页)

Leu-OMe 形式存在。同理,方程式如下:



归纳三方程可得



因此,随着反应的进行底物氨基酸逐渐被反应完全,过量的  $\text{KHCO}_3$  存在下体系 pH 值升高。

### 参考文献:

- [1] Zaks A, Klibanov A M. Influence of organic solvents on papain kinetics[J]. *Science*, 1984, 224:1249-1251.
- [2] 闫爱新,田桂玲,叶蕴华. 蛋白酶在有机合成中的应用的新进展[J]. *化学进展*, 2001, 13:203-208.
- [3] 沈鸿雁,田桂玲,叶蕴华. 非水介质中酶催化反应研究新进展[J]. *有机化学*, 2003, 23:221-229.
- [4] Halling P J, Eichhorn U, Kuhl P. Thermodynamics of solid-to-solid conversion and application to enzymic peptide synthesis[J]. *Enzyme Microb Technol*, 1995, 17:601-606.
- [5] Erbdinger M, Ni X W, Halling P J. Kinetics of enzymatic solid-to-solid peptide synthesis: Synthesis of Z-aspartame and control of acid-base conditions by using inorganic salts[J]. *Biotechnol Bioeng*, 2001, 72:69-76.
- [6] 鞠培培,黄克文,沈树宝,等. 拟低共熔体系中脂肪酶水解拆分萘普生酯[J]. *化工学报*, 2003, 54(7):1025-1028.
- [7] 黄振龙,陈英文,沈树宝. 高固液比生物催化体系的研究进展[J]. *化工进展*, 2005, 24:155-158.
- [8] Ulijn R V, Janssen A, Halling P J. Predicting when precipitation-driven synthesis is feasible: Application to biocatalysis[J]. *Chem Eur J*, 2001, 10:2089-2098.
- [9] Elegmann A V, Tattersall R. Energetics of Peptide bond formation at elevated temperatures[J]. *J Mol Evol*, 1979, 12:349.

(责任编辑:杨萌)

(上接第19页)

制备出免疫原和包被原。用免疫原免疫新西兰大白兔,获得的抗体效价达到  $1:12\ 800$ ,其工作质量浓度为  $2\ \mu\text{g}/\text{mL}$ ,抗体稀释倍数为  $1:10\ 000$ 。其标准曲线在  $5.105 \times 10^{-3} \sim 3.972 \times 10^{-1}\ \mu\text{g}/\text{mL}$  线性范围内呈相关性,抗体对薯蓣皂苷有特异性识别。

除具有较宽的检测范围外,最低检测限可达到  $2.468 \times 10^{-3}\ \mu\text{g}/\text{mL}$ ,而且免疫学检测方法还具有前处理简单,分析成本低等优点,适宜于对现场及实验室大批量样品进行快速测定,为黄精皂苷 ELISA 检测方法的建立创造良好的基础条件。

### 参考文献:

- [1] Darcy R Driedger, Peter Sporns. Development of an antibody against diosgenin and spiroaminoketal alkaloids[J]. *Food and Agricultural Immunology*, 2001, 13:33-38.
- [2] Chu F S, Grossman S, Wei R D, et al. Production of antibody against T-2 toxin[J]. *Appl Environ Microbiol*, 1979, 37(1):104-108.
- [3] Wang Shu-cai, Zhou Xie, Sang Yong-ming. Establishment of indirect enzyme linked immunosorbent assay for salicylic acid[J]. *Plant Physiology Communications*, 1997, 33(6):441-444.
- [4] 朱立平,陈学清. 免疫学常用实验方法[M]. 北京:人民军医出版社,2000. 18-22.
- [5] 甄永苏,邵容光. 抗体工程药物[M]. 北京:化学工业出版社,2002. 95-96.
- [6] Manju Aarkar, Shashi B Mahato. Homogeneous enzyme immunoassay of diosgenin and its glycosides[J]. *Analytical Biochemistry*, 1984, 136:168-174.
- [7] Li K, Li Q X. Development of an enzyme-linked immunosorbent assay for the insecticide imidacloprid[J]. *Journal of Agricultural Food Chemistry*, 2000, 48:3378-3382.

(责任编辑:李春丽)