论著

文章编号:1000-5404(2009)21-2128-03

石杉碱甲人工抗原的合成、鉴定及免疫原性分析

宋建武[1],晁 志[2],董为人[1] (南方医科大学:[1]基础医学院组织学与胚胎学教研室,[2]中医药学院,广州 510515)

摘 要:目的 制备乙酰胆碱脂酶抑制活性成分石杉碱甲(huperzine A, HupA)的人工抗原及抗血清。**方法** 将HupA与戊二醛、载体蛋白牛血清白蛋白(BSA)反应偶联,制得半抗原-载体蛋白复合物后,用基质辅助激光解吸飞行时间质谱测定其中结合的半抗原数目;以此抗原免疫BALB/c小鼠,制备抗血清,并通过ELISA法检测其抗体效价和特异性。**结果** 合成的人工抗原HupA-GA-BSA中HupA与BSA的结合比约为8∶1;免疫小鼠得到特异针对HupA的抗血清,HupA抗体的效价为1∶62 500。**结论** 成功地合成了HupA的人工抗原,且该抗原有较好的免疫原性。

关键词: 石杉碱甲;半抗原-载体蛋白复合物;免疫原性;酶联免疫吸附测定
中图法分类号: R284.3; R392-33; R392.7 **文献标识码:** A

Synthesis of huperzine A-bovine serum albumin conjugate and its immunogenicity in mice

SONG Jian-wu[1], CHAO Zhi[2], DONG Wei-ren[1] ([1]Department of Histology and Embryology, College of Basic Medicine, [2]School of Traditional Chinese Medicine, Southern Medical University, Guangzhou 510515, China)

Abstract: Objective To prepare huperzine A-carrier protein conjugate and determine its immunogenicity for later production of monoclonal antibody against HupA and establishing an enzyme-linked immunosorbent assay (ELISA)-based detection method for HupA. **Methods** HupA was conjugated with bovine serum albumin (BSA) using glutaraldehyde (GA) method to obtain the HupA-GA-BSA conjugate, and the hapten number in the conjugate was determined by matrix-assisted laser absorption ionization time-of-flight mass spectrometry (MALDI-TOF-MS). BALB/c mice were immunized with HupA-GA-BSA to prepare the antiserum against HupA. The serum titer and specificity of the HupA antibodies were detected by indirect ELISA and competitive ELISA, respectively. **Results** The conjugation ratio of HupA and the carrier protein BSA was 8∶1. The antiserum against HupA with a titer of 1∶62 500 was obtained after immunizing the mice with the conjugate, and the antiserum reacted specifically to HupA. **Conclusion** The synthesized HupA-GA-BSA conjugate possesses good immunogenicity in mice, suggesting the feasibility of preparing the monoclonal antibody against HupA using this conjugate.

Key words: Huperzine A; hapten-carrier protein conjugate; immunogenicity; enzyme-linked immunosorbent assay

石杉碱甲(huperzine A,HupA)是从中国石杉科石杉属蛇足石杉(huperzia serrata)中分离得到的一种天然新型石松类生物碱有效单体,为高效、高选择性的乙酰胆碱脂酶(AChE)抑制剂。HupA在治疗阿尔茨海默症(alzheimer's disease)方面有显著疗效。近年的研究发现,HupA具有调控神经生长因子的表达与分泌、抗谷氨酸受体等神经保护作用,它不仅是一种高效高选择性的中枢乙酰胆碱酯酶抑制剂,而且还通过对抗谷氨酸引起的兴奋毒性、抗氧化应激、抗细胞凋亡等途径,对细胞产生保护,具有治疗多种神经退行性疾病的潜在作用[1]。

HupA是石杉属药用植物中有效成分的定量指标,目前检测HupA的常用方法有紫外分光光度法(UV)[2]、薄层扫描法(TLCS)[3]、高效液相色谱法(HPLC)[4]等,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。ELISA法,具有较高的灵敏度,可同时分析较大量样品,在中药材质量检测领域有较好的应用前景。要建立ELISA,首先要得到抗HupA的抗体,但HupA相对分子质量较小,为不能直接引发免疫反应的半抗原,必须和大分子的载体蛋白如牛血清白蛋白(BSA)、钥孔蠕血蓝蛋白(KLH)等偶联之后构成完全人工抗原,才能应用于免疫操作。本实验合成HupA的人工抗原,观察其免疫原性,为制备HupA的单克隆抗体、建立快速检测HupA的酶联免疫吸附

作者简介:宋建武,男,新疆维吾尔族自治区乌鲁木齐市人,硕士研究生,讲师,主要从事抗体工程方面的研究。电话:(020)61647792
通信作者:晁 志,电话:(020)61648256,E-mail: chaozhi1971@yahoo.com.cn
收稿日期:2009-05-19;修回日期:2009-07-15

测定(ELISA)法提供技术基础。

1　材料与方法

1.1　实验材料

HupA(含量为 98% ,HPLC 归一法)由上海融禾医药科技有限公司提供。牛血清白蛋白(BSA)、人血清白蛋白(HSA)、弗氏完全佐剂(FCA)、弗氏不完全佐剂(FICA)为 Sigma 公司产品;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)显色剂为美国 Pierce 公司产品。甲醇、$NaIO_4$、三氟乙酸(TFA)、芥子酸(sinapinic acid)、乙腈、硼氢化钠(sodium borohydride)、戊二醛(glutaraldehyde, GA)均为分析纯。JMS-ELITE 基质辅助激光解吸飞行时间质谱仪为日本 JEOL 公司产品。6 周龄 SPF 级雌性 BALB/c 小鼠,体质量 16 ~ 18 g,由南方医科大学动物中心提供。

1.2　HupA-GA-BSA 人工抗原的合成

HupA 3 mg 溶于 300 μl 甲醇,逐滴加入含 8 mg BSA 的 100 mmol/L $NaIO_4$(pH 7.0) 2100 μl 中;加入 2.5% 戊二醛水溶液 600 μl,搅拌 2 h;加入 4 mg/ml 的硼氢化钠 3 ml,搅拌 1 h;对水透析后冷冻干燥,即得复合物 HupA-GA-BSA。

1.3　MALDI-TOF-MS 测定复合物中 HupA 结合数目[5]

供试品处理:称取 HupA-GA-BSA 0.6 mg,溶于 8 mol/L 的尿素 30 μl 中,再稀释成适当的浓度。称取 BSA 1 mg 溶于 50 μl 水中。基质辅助溶液的配制:将 0.15 % TFA 35 μl 加到乙腈 15 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,室温干燥,置 MALDI-TOF-MS 中测定。测定时加速电压为 20 kV,栅极电压 17 kV,线性模式下操作;飞行时间通过电脑中 500 MHz 瞬态数字转换器测定,所得数据用 GRAMS/386 软件(Galactic Industries Corp. , USA)分析。

1.4　HupA-GA-BSA 人工抗原的免疫原性鉴定

1.4.1　抗血清的制备　　将 HupA-GA-BSA 溶于含 8 mol/L 尿素的 Tris-HCl 溶液,配成 20 mg/ml,以磷酸盐缓冲液(PBS)稀释到 200 μg/ml。取 1 ml 上述稀释溶液,加入 1 ml 弗氏完全佐剂,制成混悬液,以 0.5 ml 腹腔注射,免疫 BALB/c 小鼠,共 2 只。2 周后进行第 1 次加强免疫,方法同上,仅将弗氏完全佐剂改为弗氏不完全佐剂。以后每隔 2 周进行 1 次加强免疫,但不使用佐剂,直接使用 200 μg/ml HupA-GA-BSA 的 PBS 稀释液。第 3 次加强免疫 4 d 后眼球内眦采血,将所采得的血液置于硅烷化 Eppendorf 离心管中,于 10 000 r/min 离心 5 min,分离血清,进行抗体效价测定和抗体特异性检测。

1.4.2　抗体效价测定　　用 pH 9.6 碳酸缓冲液将 HupA-GA-HSA(合成方法同 HupA-BSA)配成浓度为 1 μg/ml 的溶液,以 100 μl/孔包被 96 孔免疫反应板,37 ℃孵育 1 h;用含 5% 脱脂奶粉的 PBS 溶液于 37 ℃封闭 2 h;加入从 1∶500 开始顺次 5 倍稀释的抗血清(PBS 稀释)100 μl/孔,37 ℃孵育 1 h;加入羊抗鼠酶标抗体(1∶1 000 稀释)100 μl/孔,37 ℃孵育 1 h,显色液用 ABTS,100 μl/孔,于 37 ℃反应 15 min,用酶标仪读出各孔在波长 405 nm 处的光密度值[D(405)]。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。供试血清的 D(405)值(P)与阴性对照的 D(405)值(N)之比(P/N)大于 2 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。

1.4.3　抗体特异性检测　　选取效价较高的 BALB/c 小鼠血清进行测定。以上项测得的 D(405)值在 1.0 左右的血清稀释度作为工作浓度。用 10% 甲醇将 HupA 稀释为 100、50、25、12.5、6.125 μg/ml 的系列浓度。免疫反应板经 1 μg/ml HupA-GA-HSA 包被,5% SPBS 封闭后,加入不同浓度的 HupA 溶液及抗血清各 50 μl,混匀后于 37 ℃孵育 1 h。其余步骤同 1.4.2。空白对照为 10% 甲醇 50 μl 加 PBS 50 μl。依据 D(405)值的变化判断是否发生竞争反应。

2　结果

2.1　HupA-GA-BSA 人工抗原的合成产率

冻干后的 HupA-GA-BSA 复合物质量为 5.2 mg,产物和反应物的质量比约为 50%。这一结果与人工抗原的通常合成产率基本类似[6]。

2.2　HupA-GA-BSA 人工抗原的 MALDI-TOF-MS 鉴定

BSA、GA-BSA 及 HupA-GA-BSA 的质谱图中可见 HupA-GA-BSA、GA-BSA 的相对分子质量分别为 77.0×10^3 和 75.0×10^3。已知 HupA 的相对分子质量是 242,因而,HupA-GA-BSA 复合物中,每个载体蛋白 BSA 分子上偶联约 8 个 HupA 分子(2 000/242 ≈ 8)。以此人工抗原免疫小鼠,成功取得了针对 HupA 的抗血清。

2.3　抗血清的效价及特异性分析

2 份抗血清由于小鼠的个体差异,效价各不相同。空白对照的 D(405)值为 0.128;P/N > 2(即结果为阳性)的血清最大稀释倍率为 62 500。由此可知,抗血清效价为 1∶62 500。

血清稀释 12 500 倍时,间接 ELISA 测得的 D(405)值为 1.207,以此稀释度的血清作为竞争 ELISA 的工作浓度。HupA 对 HupA-HSA 与抗血清结合的竞争结果如图 1 所示。竞争 ELISA 结果显示 D(405)值随着 HupA 竞争浓度的增加而减少,说明小鼠的抗血清具有 HupA 特异性。

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,可作为免疫原应用于单克隆抗体制备。

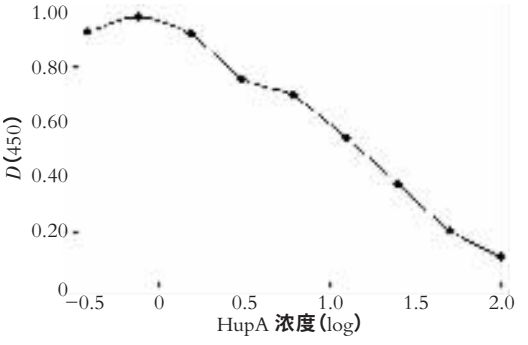


图 1　竞争性 ELISA 测定血清 HupA 抗体与游离 HupA 的特异性结合

3　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[7]。HupA 是一种胺基半抗原,我们利用戊二醛将其与 BSA 连接,然后用硼氢化钠还原反应过程中形成的希夫氏碱中的双键,以避免免疫过程中形成针对亚胺类化合物的非特异性免疫球蛋白[8]。本实验中,每个 BSA 分子上成功连接约 8 个 HupA 分子,合成效率较高,合成方法简便可行。

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。本实验测得抗血清效价为 1∶6 250,竞争 ELISA 结果显示抗血清能够特异性识别游离 HupA,证明了合成的人工抗原 HupA-GA-BSA 有较好的免疫原性,可为 HupA 的单克隆抗体的制备及后续应用提供技术基础。

本实验使用 MALDI-TOF-MS 法测定了 HupA-GA-BSA 中结合的半抗原 HupA 分子数目。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,供试品用量少,结果直观、准确,是比较理想的抗原复合物中半抗原数目的测定方法。

参考文献:

[1] 陈中华, 张秀珍. 石杉碱甲的研究进展[J]. 生命科学仪器, 2008, 6(4): 42-44.

[2] 马 燮, 杨 虎, 郝世雄, 等. 紫外分光光度法测定蛇足石杉中总生物碱含量[J]. 应用化工, 2007, 36(5): 501-502.

[3] 周汉华, 贾宪生, 高言明, 等. 薄层扫描法测定皱边石杉中石杉碱甲的含量[J]. 中药材, 2008, (2): 235-237.

[4] 顾月华, 吴庆庆. 高效液相色谱法测定蛇足石杉中石杉碱甲的含量[J]. 中国药理学通报, 2005, 21(8): 1017-1018.

[5] Zhu S, Shimokawa S, Shoyama Y, *et al*. A novel analytical ELISA-based methodology for pharmacologically active saikosaponins [J]. Fitoterapia, 2006, 77(2): 100-108.

[6] 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.

[7] 陈继明, 龚晓明, 陆承平. T 细胞表位研究进展[J]. 中华微生物学和免疫学杂志, 1998, 18(1): 78-82.

[8] Seguela P, Geffard M, Buijs R M, *et al*. Antibodies against gamma-aminobutyric acid: specificity studies and immunocytochemical results [J]. Proc Natl Acad Sci U S A, 1984, 81(12): 3888-3892.

(编辑 王小寒)

(上接 2127 页)

扭转彩超特点为睾丸附睾在阴囊内位置改变,睾丸血流灌注受阻,但睾丸血流因病程不同而有差异;睾丸附睾炎 CDFI 表现为睾丸附睾内血管增粗,睾丸以充血为主[6]。本组彩超检查确诊的,手术探查结果均与之相符。彩超快速、直观、无创、省时、可重复、普及率,应作为诊断阴囊疾病的常规及首选方法。

3.2 治疗

睾丸扭转导致睾丸缺血坏死与扭转程度和扭转持续时间相关。文献[1]报道睾丸扭转发病后 5 h 内手术复位者,睾丸挽救率为 83%;<10 h 挽救率降至 70%;>10 h 者只有 20%。故尽早诊断,一旦明确或高度怀疑者立即手术复位,可有效降低睾丸坏死切除率。本组睾丸复位成功中 5 例 <10 h;1 例为 540°(病程 4 h),另 1 例病程 24 h 睾丸扭转为 180°。睾丸扭转复位后如何判断睾丸生机是关键,本组手术中均采取以温盐水纱布睾丸湿敷 10~20 min 后观察睾丸色泽变化,如恢复红润则保留睾丸,反之则行睾丸切除,切除的睾丸术后病检证实均坏死。一侧睾丸扭转可以使对侧睾丸组织发生病理改变[7],我们提倡一旦睾丸坏死应及时切除。手法复位应注意复位方向,且不能作为睾丸扭转的最终治疗,为防再次扭转应手术复位固定。睾丸扭转多与睾丸和精索自身的解剖异常相关,本组均行对侧睾丸固定手术。因此,根据病情行睾丸复位 + 双侧睾丸固定或坏死睾丸切除同时对侧睾丸固定是治疗本病和预防复发的关键。

3.3 误诊原因

本组初诊误诊 33 例,在外院及我院初诊误诊率共 76.74%,由于诊疗延误,本组睾丸切除率 79.07%,总结睾丸扭转误诊原因有:①多数患者首先选择了县级以下医疗机构就诊。本组 31 例患者初诊医生为非专科医生的 27 位,其中诊所就诊的病例为 15 例。②对本病缺乏认识。该病发病率低,接诊时未行超声检查(或无超声设备),盲目冠予睾丸、附睾炎、肾绞痛等疾病进行治疗。本组 30 例初诊未作超声,即使行了彩超检查,也忽视了彩超的假阴性。故在疾病早期彩超假阴性时应结合临床分析,短时间复查彩超,如高度怀疑亦应及早手术探查。本院 2 例彩超提示睾丸血流改变不明显,1 例结合临床后行急诊手术探查及时挽救了睾丸,而另 1 例因对本病认识不足误诊为睾丸附睾炎,在住院后 8 h 经上级医师查房后复查彩超确诊,延误了最佳治疗时间。③阴囊疾病时忽视有发生该病可能。本组 1 例确诊为睾丸附睾炎,治疗过中症状缓解后又突然疼痛加重,当时认为是感染未控制,但治疗后无缓解,行彩超明确为睾丸扭转,及时手术复位成功。

关键词: 睾丸扭转;诊断;治疗学
中图法分类号: R697.22 **文献标识码:** B

参考文献:

[1] 吴阶平. 吴阶平泌尿外科学(下)[M]. 济南:山东科学技术出版社, 2004: 1955-1958.

[2] 傅劲草, 苟 欣, 肖明朝. 睾丸扭转误诊探讨[J]. 第三军医大学学报, 2006, 28(9): 992-993.

[3] 陈昭典, 韦思民, 蔡松良. 睾丸扭转诊治体会(附 39 例报告)[J]. 中华泌尿外科杂志, 2003, 24(7): 479-481.

[4] 杨 奕, 叶章群, 杨为明, 等. 婴幼儿睾丸扭转的早期诊断和治疗方法选择[J]. 临床泌尿外科杂志, 2005, 20(7): 412-413, 416.

[5] Kaddish H A, Bolte R G. A retrospective review of pediatric patients with epididymitis, testicular torsion, and torsion of testicular appendages[J]. Pediatrics, 1998, 102(1 Pt 1): 73-76.

[6] 张崎山, 郭应禄. 泌尿系超声诊断治疗学[M]. 北京:科学技术文献出版社, 2001: 266-267.

[7] 孙 杰, 刘国华, 赵海腾. 一侧睾丸扭转对对侧睾丸组织发育的影响[J]. 临床泌尿外科杂志, 2006, 21(7): 531-533.

(编辑 邓强庭)