

## 天然产物莪术醇单克隆抗体的制备

陈旭<sup>1,2</sup>, 钟海雁<sup>1\*</sup>, 王娟<sup>2</sup>, 曾建红<sup>1,2</sup>

(1. 中南林业科技大学, 长沙 410004; 2. 桂林医学院药学院, 广西 桂林 541004)

**摘要:** 为制备小分子化合物莪术醇的单克隆抗体, 先将莪术醇(curcumol)与载体蛋白牛血清蛋白(BSA)偶联形成完全抗原, 用基质辅助激光解吸飞行时间质谱法(MALDI-TOF-MS)鉴定莪术醇人工抗原的偶联率, 然后采用杂交瘤技术获得杂交瘤株, 并对其进行小鼠腹水的制备与纯化。结果表明: 莪术醇半抗原与载体的偶联比为 19.6, 单克隆抗体的腹水效价为 1:51 200, 获得的单克隆抗体只与莪术醇抗原发生特异反应, 聚丙烯酰胺凝胶电泳((SDS-PAGE)显示, 单克隆抗体重链的分子量为 5 000, 轻链的分子量为 2 500。得到了莪术醇单克隆抗体, 为利用免疫分析技术对莪术类药材进行质量控制与检测奠定了理论基础。

**关键词:** 天然产物; 莪术醇; 单克隆抗体; 制备

**中图分类号:** R932 **文献标识码:** A **文章编号:** 1000-3142(2011)06-0832-04

## Formation of monoclonal antibody against a major natural product curcumol

CHEN Xu<sup>1,2</sup>, ZHONG Hai-Yan<sup>1\*</sup>, Wang Juan<sup>2</sup>, ZENG Jian-Hong<sup>1,2</sup>

(1. *Central South University of Forestry and Technology*, Changsha 410004, China; 2. *Guilin Pharmaceutical School*, Guilin 541004, China)

**Abstract:** To get monoclonal antibody(mAb)against crude drug curcumol, curcumol-carrier protein conjugates were synthesized by the method that curcumol was conjugated with BSA. The ratio of hapten and bovine serum albumin in an antigen conjugate was determined by matrix-assisted laser desorption/ionization mass spectrometry(MALDI-TOF-MS). A hybridoma secreting monoclonal antibody against curcumol was produced by hybridoma technology, then preparation and purification of curcumol mAb use mice hybridoma ascitic fluid. Results showed that the ratio of hapten and bovine serum album was 19.6, the ELISA titers in the ascite fluids of the curcumol mAb were 1:51 200, ELISA analysis also proved that the curcumol mAbs reacted specifically with curcuoml antigen, polyacrylamide gel electrophoresis((SDS-PAGE) assay showed that the curcumol heavy chain was  $5.0 \times 10^4$  and the light chain was  $2.5 \times 10^4$ . Conclusion the specific anti-curcumol mAbs were prepared, which would lay a theoretical foundation for detection and quality control and immunoassay of curcuma kwangsiensis in Guangxi producing areas by Immunoassay.

**Key words:** natural product; curcumol; monoclonal antibody; preparation

莪术醇(curcumol)又名姜黄环奥醇, 姜黄醇, 属萜类化合物, 是广西莪术挥发油中的重要成分, 具有抗癌、抗早孕、抗病毒、抗突变、保肝、活血化痰等药

理作用(陈旭等, 2008; 曾建红等, 2008)。随着莪术醇在临床上的应用, 以及人们对其药理药效研究的深入研究, 莪术醇引起了人们广泛的兴趣。然而由

收稿日期: 2011-07-06 修回日期: 2011-10-06

基金项目: 国家自然科学基金(30960498); 广西自然科学基金(GXNSFA013252); 广西科技攻关与新产品试制(桂科攻 0992003A-26)[Supported by the National Natural Science Foundation of China (30960498); the Natural Science Foundation of Guangxi (GXNSFA013252); Key Scientific and Technological Research and New Product Production of Guangxi(0992003A-26)]

作者简介: 陈旭(1966-), 女, 湖南隆回人, 博士, 教授, 主要从事中药及中成药质量标准及标准物质的研究, (E-mail)junxuxu@hotmail.com.

\* 通讯作者: 钟海雁, 博士, 教授, 博士生导师, 主要从事植物可食资源评价、深度加工等研究与教学工作, (E-mail)zhonghaiyan631210@126.com.

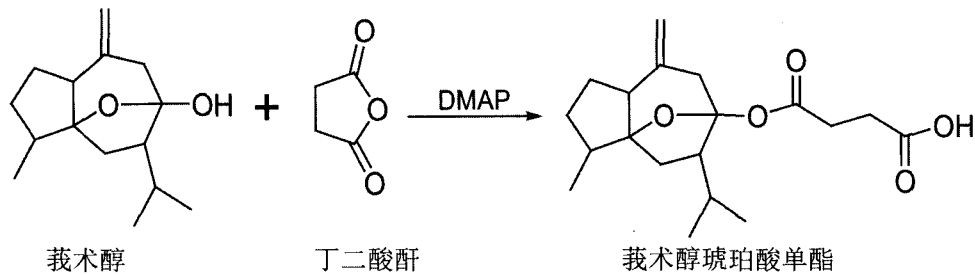
于莪术醇在药材中的含量较低,且与其他挥发性成分难分离,使得检测和分离的难度较大,检测时间长。目前莪术醇的测定方法主要有比色法、红外分光光度法、双波长扫描法、气相色谱法等方法,而上述方法在快速、批量检测方面均存在一定的缺陷(郭守军等,2010)。免疫分析方法因其具有操作简便、灵敏、稳定、快速和高通量检测的特点(Jerome等,2002;Yu等,2010;Shu等,2007;Yu等,2009),在中药材的质量监测与评价方面具有较好的应用前景。有与检测成分对应的抗体是免疫分析的关键,本实验以小分子化合物莪术醇为研究对象,合成莪术醇人工抗原(Cur-BSA),制备抗莪术醇的单克隆抗体,旨在为进一步制备莪术醇单抗试剂盒奠定基础。

## 1 材料与方法

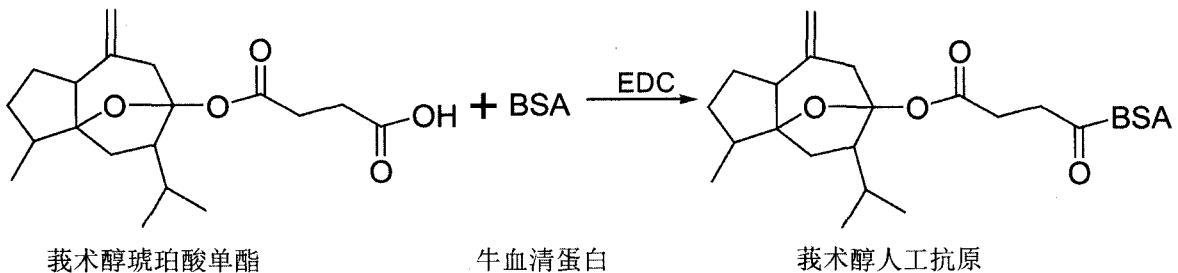
### 1.1 实验材料与试剂

4 周龄雌性 BALB/c 小鼠由本院 SPF 级实验动物中心提供;莪术醇购自中国生物制品检定所(100185-200506),Cur-BSA 抗原由本实验室制备,

#### (1) 莪术醇琥珀酸单酯(Cur-HS)



#### (2) 莪术醇人工抗原 Cur-HS-BSA



### 1.4 动物免疫及血清抗体效价的测定

选用健康雌性 4 周龄 BALB/c 小鼠作为免疫动物,免疫方案如下:初次免疫采用 100  $\mu\text{g}$  莪术醇丁二酸酯-BSA 加弗氏完全佐剂,以后每隔 2 周进行 1 次加强免疫,使用 50  $\mu\text{g}$  免疫原加弗氏不完全佐剂,共 4 次,均采用腹腔注射。每次加强免疫后 4 d 眼

聚乙二醇(PEG)4000 为 Roche 公司产品;胎牛血清为 GIBCO 公司产品;小鼠骨髓瘤细胞 Sp2/0 购自中国科学院上海生命科学研究所以;细胞培养用 DMEM-F12 液体为 Hyclone 公司产品;弗氏完全及不完全佐剂为 Sigma 公司产品;辣根过氧化物酶标记的(HRG)鼠二抗为碧云天公司产品,2,2'-azino-bis(3-ethylbenzo-thiazoline-6-sulfonic acid) diammonium salt(ABTS)、HAT 和 HT 为 sigma 公司产品,细胞培养用 96 孔、24 孔板为 Costa 公司产品;其他试剂为国产分析纯产品。

### 1.2 主要仪器

二氧化碳培养箱(311)、低温高速离心机(legend-micro17R)为 Thermo 公司产品,酶标仪(MLDEL 680)、电泳仪(DYCP-3IA)为美国 Bio-Rad 公司产品。

### 1.3 莪术醇人工抗原的合成

以莪术醇为原料,用琥珀酸酐法将丁二酸酐与莪术醇反应生成莪术醇琥珀酸单酯(Cur-HS),得到人工半抗原,然后将莪术醇的半抗原制备成吡啶水溶液,然后使之与 BSA 结合,制备出莪术醇的人工抗原即 Cur-HS-BSA,其反应方程式为:

眶取血用 ELISA 检查抗体滴度。用直接与间接 ELISA 检测小鼠体内抗体,ABTS 显色,测定 405 nm 的吸光度(A 值)。待测标本(P)与阴性对照(N)的比值(P/N)大于 2.1,则为阳性,以出现阳性反应的最高稀释度作为血清抗体效价。将血清抗体效价达到  $1 \times 10^5$  的小鼠用 100  $\mu\text{g}$  免疫原进行加强免疫

1次,3 d后用于细胞融合。

### 1.5 细胞融合

免疫3 d后处死小鼠后,取出小鼠脾脏,以5:1的比例与Sp2/0骨髓瘤细胞进行混合。融合后将细胞接种到含饲养细胞的96孔细胞培养板中,每孔75  $\mu$ L,置37  $^{\circ}$ C,5%的CO<sub>2</sub>的培养箱中培养。融合后第2天每孔加入2 $\times$ 的HAT 75  $\mu$ L,3 d后用1 $\times$ 的HAT半换液。

### 1.6 杂交瘤细胞的筛选

用ELISA法筛选阳性孔,ABTS显色,测定405 nm的吸光度(A值),筛选阳性孔,待测孔(P)与阴性对照孔(N)的比值(P/N)大于2.1为阳性孔,有限稀释法进行亚克隆化,经过3~4次亚克隆得到单克隆杂交瘤细胞。

### 1.7 抗体制备与纯化

杂交瘤腹腔注射前一周给8周龄雌性BALB/c小鼠腹腔注射石蜡油,每只0.5 mL,诱导产生腹水。10 d后收集腹水,离心得到小鼠腹水。腹水用Protein-G蛋白分离柱纯化(刘树玲等,2011;Hiroyuki Tanaka等,1999),将收集的腹水,用1 mol的Tris溶液将腹水的PH值调至7.0,然后通过蛋白分离柱,用10 mmol(pH7.0)的磷酸盐缓冲液清洗柱子,被吸附的抗体用100 mmol(pH3.0)的柠檬酸盐缓冲液洗脱下来,再用1 M的Tris溶液中和,以pH7.4的PBS对冲透析3次,最后冻干。用间接ELISA法检测腹水和单抗细胞培养上清液的抗体效价。以1  $\mu$ g/mL单克隆抗体包被96孔板,每孔100  $\mu$ L,酶标记抗体为HRP标记的羊抗小鼠IgG。单克隆抗体的效价用腹水和细胞培养上清液的稀释度表示。

## 2 结果与分析

### 2.1 Cur-BSA完全抗原的MALDI-TOF-MS检测结果

用MALDI-TOF-MS鉴定莪术醇人工抗原,如图1所示从MALDI-TOF-MS图谱可明显看出Cur-HS与BSA偶联形成了复合物,该复合物的相对分子质量约为73 302;与BSA(66 713)以及Cur-HS(336)相比我们可以求出Cur.-HS-BSA的偶联比为19.6,本实验中人工合成的半抗原-蛋白复合物Cur-HS-BSA的偶联数值较大,每个载体蛋白分子平均与19.6个半抗原分子结合。

### 2.2 免疫小鼠血清抗体效价检测

细胞融合前3 d小鼠眼眶取血,ELISA分析小

鼠血清中抗体效价。判定标准(舒震等,2010):阳性血清OD值在1.0左右,同时与阴性血清OD值差距最大的抗体稀释度为最佳工作浓度。以空白孔调零,待测孔OD值大于或等于阴性对照孔的2.1倍为阳性,阳性值中对应的最大稀释倍数即为血清效价。根据方阵法确定ELISA方法的最佳阳性血清最佳稀释度为1:6 400,血清效价达1:100 000(表1)。

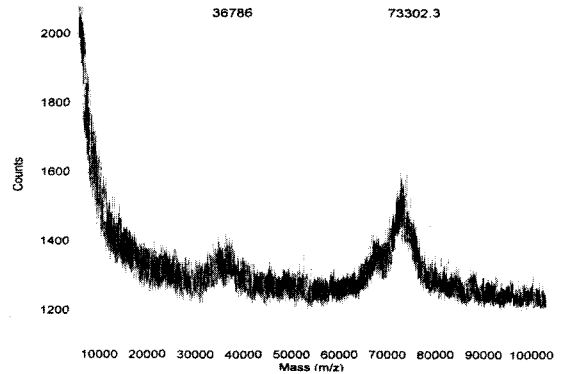


图1 Cur-HS-BSA MALDI-TOF-MS 谱图

Fig. 1 MALDI-TOF-MS picture of Cur.-HS-BSA

表1 血清稀释度和效价测定结果

Table 1 The result of serum dilution and titre detection

血清稀释度 Serum dilution	405A 值 405A value				
	1	2	3	4	5
1:100	1.601	1.413	1.490	0.134	0.076
1:200	1.557	1.381	1.334	0.124	0.078
1:400	1.542	1.254	1.182	0.124	0.079
1:800	1.532	1.132	1.176	0.139	0.076
1:1600	1.457	1.111	0.921	0.135	0.076
1:3200	1.317	1.004	0.912	0.135	0.076
1:6400	1.016	0.816	0.738	0.139	0.078
1:12800	0.891	0.791	0.619	0.135	0.077
1:51200	0.667	0.567	0.524	0.135	0.076
1:102400	0.459	0.379	0.342	0.124	0.078
1:204800	0.349	0.268	0.238	0.124	0.076

注:1,2,3代表免疫小鼠,4为阴性小鼠,5为空白调零孔。

Note: 1,2,3 were the immune mouse, 4 is the control mice, 5 is the blank.

### 2.3 细胞融合与阳性杂交瘤细胞的筛选克隆

融合后第10天采用间接ELISA法和竞争ELISA法进行阳性克隆的筛选,经过4次亚克隆,得到1株能够稳定分泌莪术醇抗体的杂交瘤细胞,命名为4-9B2。经过多次传代、冻存、复苏后仍具有稳定分泌莪术醇抗体的能力。

### 2.4 腹水效价测定及性质鉴定

用间接ELISA法测得抗体效价为1:51 200,

细胞培养上清液效价为 1:1 600~1:3 200,所得的单克隆抗体我们用竞争 ELISA 法分析其特异性,将所得抗体稀释 100 倍后与莪术醇、莪术酮、吉马酮、连翘甙、芦丁、小檗碱测试,ABTS 显色后,仅与莪术醇发生特异性反应,莪术醇组无颜色反应,其它均出现蓝绿色光,405nm 吸收值测定莪术酮、吉马酮、连翘甙、芦丁、小檗碱的吸光度值与阴性组相比差异无显著,吸光度值高达 0.653,而莪术醇的吸光度值为 0.112,用 SPSS 软件分析差异极显著。

我们将冻干抗体用蛋白裂解液稀释,再采用 12% 的 SDS-PAGE 进行了分析见图 2,重链相对分子质量为 5 000,轻链为 2 500,均与电泳结果相符合。

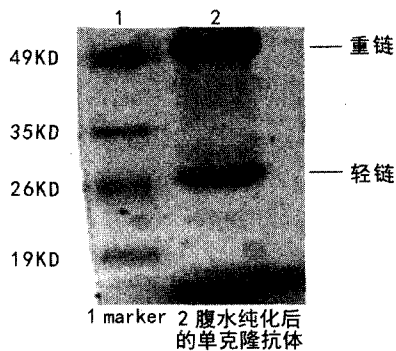


图 2 莪术醇单克隆抗体的 SDS-PAGE 凝胶电泳图  
Fig. 2 The SDS-PAGE picture of curcumol monoclonal antibody

### 3 结论

莪术醇为小分子天然化合物,相对分子量 236.35,仅具有反应原性,而不具有免疫原性,因此需要与大分子蛋白等偶联形成复合物后才能成为完全抗原。小分子往往不直接与载体蛋白连接,通过偶联剂与载体蛋白交联。本研究莪术醇结构中存在 C<sub>6</sub> 羟基的特点,先将莪术醇制备成莪术醇琥珀酸单酯(半抗原),然后再与 BSA 和 HSA 偶联形成复合物,从而成为完全抗原。半抗原与载体偶联后,还需要进行对偶联好的完全抗原的偶联比率进行评价,这直接关系到合成的成功与否以及抗体制备的质量。偶联比率并不是越高越好,一般说来,载体与半抗原分子的最佳偶联比为 1:5~20 (Robns 等,1986)。本实验通过 MALDI-TOF-MS 检测到莪术醇的偶联率为 19.6,这说明莪术醇的偶联效果比较好。动物免疫实验也表明,制备的免疫原能够刺激

机体产生免疫应答,免疫 2 次后的小鼠血清当中检测到了效价较高的抗体。细胞融合是单克隆抗体的关键步骤,血清的选择、培养基的选择、PEG 的选择、细胞状态、脾细胞的取出过程、脾细胞与骨髓瘤细胞的比例、每孔接种的细胞数等都可以影响到细胞融合的效果,本实验中 PEG 的温度和加 PEG 的速度是融合成功的关键。有报道指出利用单克隆抗体的 ELISA 法来测定天然药物活性成分的含量,结果与高效液相色谱法得到的一致,但是操作过程简单、快速、灵敏 (Jing 等,2006),本次研究首次报道了莪术的活性成分莪术醇单克隆抗体的制备,这为后续的莪术醇 ELISA 试剂盒的分析提供实验基础,同时也为莪术醇含量的测定提供新的方法。

免疫分析因其具有快速、灵敏、精确和简便等特点,可用于大规模生产的中药质量控制、中草药原料药的鉴定、中药活性成分的体内分析及中草药有效成分的纯化等诸多方面,本实验制备出的莪术醇单克隆抗体为利用酶联免疫吸附方法对含莪术醇的中草药进行定性或定量分析提供了可能,同时为完善中药的质量评价体系和方法起到积极的作用。

### 参考文献:

- Chen X(陈旭), Zeng JH(曾建红). 2008. Effect of light intensity on volatile oil and curcumol content in *Curcuma kwangsiensis* (光照强度对广西莪术挥发油及莪术醇含量的影响)[J]. *Guihaia*(广西植物), **28**(5):694-697
- Zeng JH(曾建红), Chen X(陈旭), Pan YW(潘艳薇), et al. 2008. Advances in curcumol(莪术醇的研究进展)[J]. *J Chin Med Mat*(中药材), **31**(1):168-170
- Guo SJ(郭守军), Yang YL(杨永利), She JB(余建宝). 2010. Determination of carbohydrates in seed gum of *Crotalaria mucronata* by HPLC(高效液相色谱法分析猪屎豆种子胶多糖中的单糖组成)[J]. **30**(3):422-425
- Jerome N, Andrea B, Carmelo T, et al. 2002. A competitive ELISA to Detect Brevetoxins from *Karenia brevis* (formerly *gymnodinium breve*) in seawater, shellfish, and mammalian body fluid[J]. *Environ Health Pers-Pect*, **110**(2):179-185
- Yu Z, Yan-SL, Feng GP, et al. 2010. Development of a new monoclonal antibody based direct competitive enzyme-linked immunosorbent assay for detection of brevetoxins in food samples[J]. *Food Chem*, **118**:467-471
- Shu HZ, Osamu M, Shinichi Shimokawa, et al. 2007. Eastern blotting and use of anti-saikosaponin monoclonal antibodies for detection of saikosaponins[J]. *J Nat Med*, **61**:178-183
- Yu Z, Feng GP, Yan SL, et al. 2009. Colloidal gold probe-based immunochromatographic assay for the rapid detection of brevetoxins in fishery product samples[J]. *Biosens Bioelectr*, **24**:2 744-2 747

(下转第 831 页 Continue on page 831)

度才有利于细胞的生长。

### 3.2 不同种类的液体培养基对淫羊藿悬浮体系建立的影响

不同种类的液体培养基对植物细胞的生长和次生产物的形成有很大的影响。目前, 比较适合多种植物的一般营养条件的培养基, 有多种配方可供选择, 如 MS, KC, White, B<sub>5</sub>, N<sub>6</sub>, LS 等, 有的研究表明降低培养基中氮源的总浓度能促进黄酮类化合物的合成(Yamakawa, 1983)。本实验结果也表明含低浓度铵的 B<sub>5</sub> 培养基有利于巫山淫羊藿细胞生长及黄酮类化合物的合成。

综上所述, 利用松脆的胚性愈伤组织, 可很容易地建立起理想的巫山淫羊藿悬浮细胞培养体系。悬浮体系保存在 B<sub>5</sub> 基本培养基中并附加 1.0 mg · L<sup>-1</sup> 2, 4-D 和 0.2 mg · L<sup>-1</sup> BA, 蔗糖浓度 40 g · L<sup>-1</sup>, 接种量每 30 mL 为 2 g, 这样建立起的悬浮细胞培养体系能获得高产黄酮的含量可接近淫羊藿黄酮的含量。说明建立悬浮细胞培养体系研究细胞生长和次生产物积累规律对于植物细胞培养放大和提高次生产物得率具有重要意义, 也是未来植物细胞培养生产次生产物发展的主要方向。

### 参考文献:

- 王海波. 1994. 植物组织及细胞培养通用分析模式的探索[D]. 北京: 中国农业科学
- 王海波. 1991. 组织培养中的细胞状态调控[J]. 作物杂志, 3: 3-6
- 朱朝德, 张转平, 孙全明, 等. 1998. 箭叶淫羊藿叶中总黄酮及淫羊藿甙含量的动态变化研究[J]. 中国中药杂志, 23(1): 21-26
- 朱朝德, 胥道宝. 1993. 5种淫羊藿中淫羊藿甙含量的比较[J]. 中国中药杂志, 18(6): 332
- 李文魁, 林新, 罗崇念, 等. 1995. 近年来国内淫羊藿甙研究概况[J]. 西北药学杂志, 10(3): 138-140

- 国家药典委员会. 2000. 中华人民共和国药典(一部)[S]. 北京: 化学工业出版社: 267
- 胡筱, 魏毅, 沙玫. 2004. 淫羊藿中总黄酮的超声提取工艺的研究[J]. 海峡药学, 16(4): 88-89
- 韩素菊, 黎云祥, 胥晓, 等. 2007. 箭叶淫羊藿胚性愈伤组织诱导及其黄酮类化合物的总含量测定[J]. 中国中药杂志, 32(23): 2551-2553
- 颜秋生, 张雪琴, 腾胜, 等. 水稻原生质体培养技术体系的建立[A]. 华南农业大学, 农业科学集刊编辑委员会. 农业科学集刊第二集: 农作物原生质体培养
- Chen CS(陈崇顺), Robert J. 1994. Acquisition of friable calli from stems and establishment of the cell suspension cultures of *Prunus armeniaca* cv. Canino and Luizet(杏茎脆散型愈伤组织的获取及细胞悬浮体培养的建立)[J]. *J Plant Res Environ*(植物资源与环境), 3(2): 22-26
- Dornenburg H, Seydel P. 2008. Effect of irradiation intensity on cell growth and kalata B1 umulation in *Oldenlandia affinis* cultures[J]. *Plant Cell Tissue Organ Cult*, 92: 93-99
- Guo BL(郭宝林), Xiao PG(肖培根). 1999. The flavonoids in *Epimedium* and their taxonomic significance(淫羊藿属植物中的黄酮类成分及其分类学意义)[J]. *Acta Phytot Sin*(植物分类学报), 37(3): 228-243
- Li SS(李士生), Zhang YL(张玉玲). 1990. Studies on tissue culture of wheat immature inflorescences and the differentiation of calli (小麦幼穗的组织培养及愈伤组织的分化研究)[J]. *J Wuhan Bot Res*(武汉植物学研究), 8(4): 349-354
- Li JJ(李晶晶), Yu SF(于世凤), Li TJ(李铁军), et al. 2002. In vitro study of the effects of *Epimedium* on osteoclastic bone resorption in various oral mineralized tissue(淫羊藿对口腔各矿化组织破骨细胞性骨吸收的体外实验研究)[J]. *China J Stomatol*(中国口腔医学杂志), 37(5): 391
- Wu LQ(武利勤), Guo SX(郭顺星), Xiao PG(肖培根). 2005. Cell suspension culture and flavonoids production in *Saussurea involucre* (新疆雪莲细胞悬浮系的建立和黄酮类活性成分的产生)[J]. *Chin J Stomatol*(中国口腔医学杂志), 30(13): 965-968
- Yamakawa T, Kato S, Ishida K, et al. 1983. Production of anthocyanins by vitis cells in suspension culture [J]. *Agric Biol Chem*, 47(10): 2185-2190
- Yang F(杨帆), Zhao J(赵君), Zhang ZW(张之为), et al. 2010. Advances in plant suspension cells(植物悬浮细胞的研究进展)[J]. *Life Sci Res*(生命科学研究), 14(3): 257-262

( 上接第 835 页 Continue from page 835 )

- Shu Z(舒震), Hou DY(侯登勇), Li J(李晶). 2010. Preparation and Identification of Anti-Human B7-H1 Monoclonal Antibody (抗人 B7-H1 单克隆抗体的制备和鉴定)[J]. *Lett Biotech*(生物技术通讯), 21(4): 531-534
- Liu SL(刘树玲), Yang XX(杨秀旭), Li H(李浩), et al. 2011. Preparation and characterization of murine monoclonal antibodies against ESAT-6 antigen of mycobacterium tuberculosis(结核分枝杆菌 ESAT-6 抗原鼠单克隆抗体的制备及初步鉴定)[J]. *Lett Biotech*(生物技术通讯), 22(2): 258-260
- Hiroyuki T, Noriko F, Yukihiro S, et al. 1999. Formation of mon-

- oclonal antibody against a major ginseng component, ginsenoside Rb1 and its characterization[J]. *Cytotechnology*, 29: 115-120
- Robns RJ. 1986. The Measurement of Low-Molecular-Weight, Non-Immunogenic Compounds by Immunoassay [M]//Lnskens HF(eds). *Immunology in Plant Sciences* Berlin:Springer-Verlag: 86-108
- Jing Z, Gang L, Baomin W, et al. 2006. Development of a monoclonal antibody-based enzyme-linked immunosorbent assay for the analysis of glycyrrhizic acid[J]. *Anal Bioanal Chem*, 386: 1735-1740