

黄 陈,于生兰,徐加兵,等. 黄芪甲苷免疫亲和色谱介质的制备及应用[J]. 江苏农业科学,2020,48(3):218-221.

doi:10.15889/j.issn.1002-1302.2020.03.039

黄芪甲苷免疫亲和色谱介质的制备及应用

黄 陈¹,于生兰¹,徐加兵²,秦 枫³

(1. 江苏农牧科技职业学院,江苏泰州 225300; 2. 江苏省扬州市食品药品检验检测中心,江苏扬州 225000;

3. 江苏兽医生物制药高技术重点实验室,江苏泰州 225300)

摘要:旨在提出 1 种新的具有高灵敏度、特异性抗黄芪甲苷(AST)单克隆抗体的纯化方法,从而为制备具有类似活性基团的其他天然化合物的亲和层析树脂方法提供参考。用 AST 与环氧活化琼脂糖 6B(EAS6B)偶联制备的免疫亲和柱从小鼠腹水中纯化抗 AST 的高敏单克隆抗体(mAbs),与用 G-葡聚糖凝胶从小鼠腹水中纯化的抗 AST 单克隆抗体进行比较,通过间接 ELISA(酶联免疫吸附测定)和间接竞争 ELISA 比较 2 种方法纯化的单克隆抗体,评价亲和培养基的效用。间接 ELISA 结果显示,用 AST-EAS6B 柱纯化的抗 AST 单克隆抗体的效价略高于用 G-葡聚糖凝胶柱纯化的抗体效价;间接竞争 ELISA 结果显示,用 AST-EAS6B 柱纯化的抗 AST 单克隆抗体的结合抑制 50% 浓度(IC₅₀)为 0.005 μg/mL,用 G-葡聚糖凝胶柱纯化的抗 AST 单克隆抗体的 IC₅₀为 0.05 μg/mL,用 AST-EAS6B 柱纯化的抗 AST 单克隆抗体比用 G-葡聚糖凝胶柱纯化的抗 AST 单克隆抗体对 AST 更具有特异性。

关键词:亲和色谱层析介质;黄芪甲苷;环氧活化琼脂糖凝胶 6B;ELISA;SDS-PAGE

中图分类号: O657.7 **文献标志码:** A **文章编号:** 1002-1302(2020)03-0218-04

目前纯化抗体的方法主要包括不同组合的 G 蛋白纯化、离子交换法和排阻色谱技术等^[1]。然而,这些方法有时不能有效分离出某些特异性抗体^[2]。因此,使用这些非特异性纯化方法分离的抗体还不能完全满足许多研究应用的要求^[3]。免疫亲和色谱(IAC)是一种液相色谱,其中固定相由抗体或抗原试剂组成,该技术代表亲和色谱的一个特殊亚类,其中的生物相关结合剂用于选择性纯化或分析目标化合物^[4]。由于抗体与它们各自的靶标能够选择性和特异性结合,这使它们作为亲和色谱中的固定配体多年来倍受关注。IAC 使用的主要方法是利用固定化靶标进行抗体纯化^[5]。

黄芪甲苷(astragaloside IV,简称 AST)是中药黄芪药理活性的主要物质之一,为黄芪及其制剂质量鉴定的指标成分。药理研究结果表明,AST 具有调节机体免疫力、保护组织器官、降低血糖、抗细胞凋亡和抗炎抗病毒等多方面的作用,具有非常广阔的发展前景^[6]。本研究以黄芪甲苷为配体,采用环氧活化琼脂糖 6B(EAS6B)亲和色谱法,从小鼠腹水中

纯化抗 AST 单克隆抗体。用间接酶联免疫吸附测定(enzyme linked immunosorbent assay,简称 ELISA)和间接竞争 ELISA 对用 AST-EAS6B 纯化的抗体与用 G-葡聚糖亲和色谱纯化的抗体的效价和特异性进行比较。

1 材料与方法

1.1 材料

AST 标准品,成都曼特生物技术有限公司(成都);3,3',5,5'-四甲基联苯胺(TMB)底物缓冲液,北京索莱宝科技有限公司(北京);辣根过氧化物酶(HRP)标记山羊抗小鼠 IgG⁺[免疫球蛋白(IgG)二抗],武汉博斯特生物科技有限公司(武汉);环氧活化琼脂糖 6B,购自 Sigma-Aldrich(圣路易斯,美国);本研究所用其他化学药品均购自中国药品化学试剂有限公司(北京)。

AST-卵清蛋白(AST-OVA)和含有抗 AST 单克隆抗体的小鼠腹水,由笔者所在实验室制备,前期笔者所在研究团队对黄芪甲苷人工抗原的合成与评价进行了研究^[7]。

1.2 方法

1.2.1 亲和介质的制备(AST-EAS6B) AST 在固体载体上的共价偶联是根据制造商对环氧活化的琼脂糖凝胶 6B(Sigma-Aldrich)和相关文献的说

收稿日期:2019-01-04

基金项目:江苏省泰州市工业支撑项目(编号:TG201322)。

作者简介:黄 陈(1981—),男,江苏南京人,硕士,讲师,主要从事药理学研究。E-mail:brightblade1999@sina.com。

明进行的。方法如下:将 0.2 g EAS6B 悬浮在 50 mL 蒸馏水中,在溶胀后(1 g 冻干粉末约产生 3.5 mL 最终体积的介质),用 200 mL 蒸馏水洗涤介质 1 h;将 10 mg AST 溶于 5.1 mL 甲醇(体积分数为 80%,pH 值为 11.0)中,将含有 AST 的溶液与介质在塞式容器中混合,并在 40 °C 下于水浴中振摇 16 h,过量 AST 用甲醇(体积分数为 80%)洗涤。然后将培养基转移至 1 mol/L 乙醇胺(pH 值为 8)中,于 50 °C 过夜。最后,用 1 mol/L Tris - HCl 缓冲液(pH 值为 8,含有 0.5 mol/L NaCl)彻底冲洗产品 3 次。空白介质(指未用 AST 耦合的环氧活化琼脂糖凝胶 6B 介质)的具体制备方法如下:将 0.2 g EAS6B 悬浮在 50 mL 蒸馏水中,溶胀后(1 g 冻干粉末约产生 3.5 mL 最终体积的介质)用 200 mL 蒸馏水洗涤介质 1 h;然后将培养基转移至 1 mol/L 乙醇胺(pH 值为 8)中,于 50 °C 过夜;最后用 1 mol/L Tris - HCl 缓冲液(pH 值为 8,含有 0.5 mol/L NaCl)彻底冲洗产品 3 次。

1.2.2 抗 AST 单克隆抗体的纯化 为了用 AST - EAS6B 纯化抗 AST 抗体,本试验制备了免疫亲和色谱柱,从含抗 AST 单抗的 5 mL 小鼠腹水中纯化了活性抗 AST 单抗。将 AST - EAS6B 介质装入 1 个普通的固相萃取柱中,上部、下部装上筛板。对固相萃取出液进行收集,并利用紫外分光光度计(Huxi HD - 21 - 2)进行分析。用偶联缓冲液洗涤柱子,直到流出液在 280 nm 处的吸光度为 0。然后,用 10 倍柱体积的纯化水冲洗,并用 10 倍柱体积的 0.01 mol/L 磷酸盐缓冲液($\text{NaH}_2\text{PO}_4/\text{Na}_2\text{HPO}_4$, pH 值为 7.0)平衡。用 20 mL 平衡缓冲液稀释含抗 AST 单抗的小鼠腹水(5 mL),以 0.3 mL/min 的流速装入柱中。样品装入后,用 10 倍柱体积的平衡缓冲液冲洗,然后用洗脱缓冲液(0.1 mol/L 甘氨酸缓冲液,pH 值为 2.7)洗脱 mAb(单克隆抗体,指 AST 单抗),直到流出液在 280 nm 处的吸光度为 0,洗脱的抗体立即用 Tris 碱中和。用 G - 葡聚糖凝胶纯化单克隆抗体时,将 G - 葡聚糖凝胶装入固相萃取柱中,上部、下部装上筛板,后续方法与上述用 AST - EAS6B 纯化抗 AST 抗体的方法相同。为了比较,使用“1.2.1”节的空白介质制备的柱纯化 5 mL 小鼠腹水作为对照。纯化后,用十二烷基硫酸钠 - 聚丙烯酰胺凝胶电泳(SDS - PAGE,10% 丙烯酰胺)分离,用考马斯亮蓝(CBB)染色,用微量蛋白 UV 定量仪测定纯化的单克隆抗体浓度^[8-9]。

1.2.3 间接 ELISA 和间接竞争 ELISA 检测抗 AST 单克隆抗体 用间接 ELISA 检测时,将 AST - OVA 用 0.05 mol/L 碳酸盐缓冲液(pH 值为 9.6)溶解成浓度为 1.25 $\mu\text{g}/\text{mL}$,包裹在 96 孔微量滴定板(美国康宁公司)上,于 4 °C 孵育过夜;用含 0.05% 吐温 20 的磷酸盐吐温缓冲液冲洗 3 次,再用 1% (m/V) 脱脂奶粉在 37 °C 磷酸盐缓冲液中封闭 1 h,封闭非特异性蛋白结合位点。将纯化的单克隆抗体、阴性对照组(生理盐水)和空白对照组(用相同方法纯化的无单克隆抗体的正常小鼠腹水)在磷酸盐缓冲液中稀释至 1 : 1 000 ~ 1 : 50 000,每孔加入 100 μL ,1 式 3 份。将微孔滴板在 37 °C 下孵育 60 min,用磷酸盐吐温缓冲液洗涤,在每个孔中加入 1 : 5 000 稀释的辣根过氧化物酶(HRP)标记山羊抗小鼠 IgG^+ 。将平板在 37 °C 下孵育 1 h,洗净,加入 TMB 基质溶液(含 0.2 mg/mL TMB,将 50 μL 30% H_2O_2 溶解在 10 mL 0.1 mol/L 柠檬酸盐 - 0.2 mol/L 磷酸盐缓冲液中,pH 值为 5.2),将平板在室温下孵育 30 min,用 50 μL 2 mol/L H_2SO_4 终止反应,使用 BioTek ELx800 ELISA 阅读器在 450 nm 波长下测量吸光度^[10],试验 1 式 3 份,以平均值作为最终值。用间接竞争 ELISA(idcELISA)方法检测纯化的抗 AST 单克隆抗体的特异性时,以 50 μL 连续稀释的 AST 为竞争物,与 50 μL 最佳稀释的纯化抗 AST 单克隆抗体一同加入微孔中,1 式 2 份。在阳性对照孔中,抗 AST 单克隆抗体没有添加任何竞争物 AST,其他步骤与间接 ELISA 所描述的步骤相同。

2 结果与分析

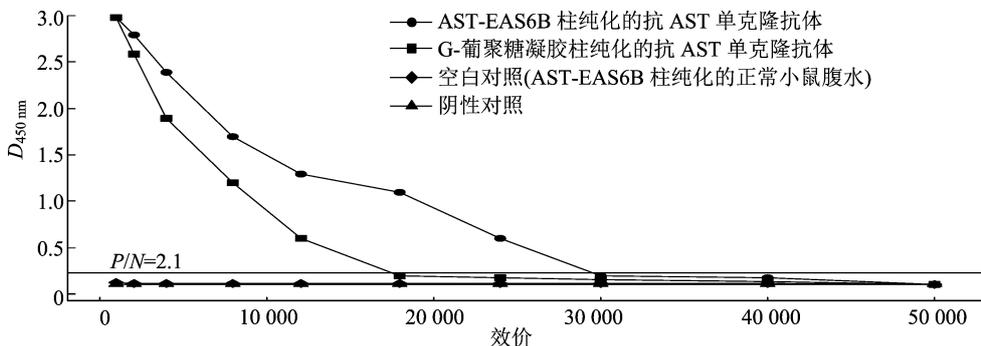
在抗 AST 单克隆抗体的纯化步骤中,从加入 5 mL 小鼠腹水开始,将纯化的 mAb 冷冻干燥、称质量。结果表明,用 AST - EAS6B 柱纯化的抗 AST 单克隆抗体为 2.9 mg,用 G - 葡聚糖凝胶柱纯化的抗 AST 单克隆抗体为 3.5 mg。用磷酸缓冲盐溶液将 2 种方法纯化的 mAb 稀释到 1 mg/mL 的浓度,用间接 ELISA 法检测抗 AST 抗体的效价,用间接竞争 ELISA 法测定抗 AST 抗体的敏感度。如表 1、图 1 所示,用 AST - EAS6B 柱纯化的抗 AST 单克隆抗体的效价大于 25 600,而用 G - 葡聚糖凝胶柱纯化的抗 AST 单克隆抗体的效价约为 18 000。由图 2 可以看出,用 AST - EAS6B 柱纯化的抗 AST 单克隆抗体的效价略高于用 G - 葡聚糖凝胶柱纯化的抗体效价。间接竞争 ELISA 结果(表 2、图 2)显示,用

AST-EAS6B 柱纯化的抗 AST 单克隆抗体的结合抑制 50% 浓度 (IC_{50}) 为 $0.005 \mu\text{g/mL}$, 用 G-葡聚糖凝胶柱纯化的抗 AST 单克隆抗体的 IC_{50} 为 $0.05 \mu\text{g/mL}$ 。间接 ELISA、间接竞争 ELISA 检测结果表明, 阴性对照的 $D_{450 \text{ nm}}$ 显著低于抗 AST 单克隆

抗体的 $D_{450 \text{ nm}}$ ($P < 0.05$)。最终值采用 3 个重复的平均值 \pm 标准偏差。以上结果表明, 用 AST-EAS6B 纯化的抗 AST 单克隆抗体比用 G-葡聚糖凝胶柱纯化的抗 AST 单克隆抗体对 AST 更具有特异性。

表 1 2 种方法纯化的单克隆抗体效价

| 稀释倍数 | AST-EAS6B 柱纯化的抗 AST 单克隆抗体的 $D_{450 \text{ nm}}$ | | | | G-葡聚糖凝胶柱纯化的抗 AST 单克隆抗体的 $D_{450 \text{ nm}}$ | | | | 空白对照 (AST-EAS6B 柱纯化的正常小鼠腹水) 的 $D_{450 \text{ nm}}$ | | | | 阴性对照的 $D_{450 \text{ nm}}$ | | | |
|--------|-------------------------------------------------|-------|-------|-------|----------------------------------------------|-------|-------|-------|----------------------------------------------------|-------|-------|-------|----------------------------|-------|-------|-------|
| | 试样 1 | 试样 2 | 试样 3 | 均值 | 试样 1 | 试样 2 | 试样 3 | 均值 | 试样 1 | 试样 2 | 试样 3 | 均值 | 试样 1 | 试样 2 | 试样 3 | 均值 |
| 1 000 | 2.987 | 2.979 | 2.992 | 2.986 | 2.976 | 2.991 | 2.981 | 2.983 | 0.121 | 0.125 | 0.127 | 0.124 | 0.111 | 0.108 | 0.113 | 0.111 |
| 2 000 | 2.785 | 2.811 | 2.791 | 2.796 | 2.589 | 2.597 | 2.599 | 2.595 | 0.120 | 0.122 | 0.121 | 0.121 | 0.112 | 0.109 | 0.102 | 0.108 |
| 4 000 | 2.411 | 2.389 | 2.394 | 2.398 | 1.902 | 1.904 | 1.892 | 1.899 | 0.119 | 0.122 | 0.127 | 0.123 | 0.113 | 0.108 | 0.102 | 0.108 |
| 8 000 | 1.703 | 1.697 | 1.698 | 1.699 | 1.205 | 1.203 | 1.201 | 1.203 | 0.127 | 0.122 | 0.119 | 0.123 | 0.106 | 0.108 | 0.110 | 0.108 |
| 12 000 | 1.302 | 1.299 | 1.301 | 1.301 | 0.602 | 0.604 | 0.609 | 0.605 | 0.118 | 0.124 | 0.126 | 0.123 | 0.113 | 0.111 | 0.113 | 0.112 |
| 18 000 | 1.111 | 1.099 | 1.103 | 1.104 | 0.211 | 0.203 | 0.205 | 0.206 | 0.119 | 0.118 | 0.112 | 0.116 | 0.112 | 0.114 | 0.107 | 0.111 |
| 24 000 | 0.611 | 0.604 | 0.602 | 0.606 | 0.182 | 0.184 | 0.187 | 0.184 | 0.117 | 0.119 | 0.118 | 0.118 | 0.106 | 0.109 | 0.110 | 0.108 |
| 30 000 | 0.203 | 0.204 | 0.201 | 0.203 | 0.159 | 0.164 | 0.161 | 0.161 | 0.115 | 0.116 | 0.119 | 0.117 | 0.110 | 0.107 | 0.105 | 0.107 |
| 40 000 | 0.181 | 0.182 | 0.178 | 0.180 | 0.142 | 0.145 | 0.138 | 0.142 | 0.117 | 0.119 | 0.118 | 0.118 | 0.102 | 0.106 | 0.108 | 0.105 |
| 50 000 | 0.112 | 0.107 | 0.109 | 0.109 | 0.106 | 0.105 | 0.104 | 0.105 | 0.106 | 0.108 | 0.106 | 0.107 | 0.105 | 0.104 | 0.108 | 0.106 |



P/N 为阳性与阴性对照吸光度的比值。当 $P/N < 1.5$ 时, 表示呈阴性; 当 $P/N \geq 1.5$ 且 < 2.1 时, 表示可疑; 当 $P/N \geq 2.1$ 时, 表示呈阳性。将 $P/N \geq 2.1$ 时对应的抗体最高稀释倍数作为抗体的效价

图 1 2 种方法纯化的单克隆抗体效价的研究

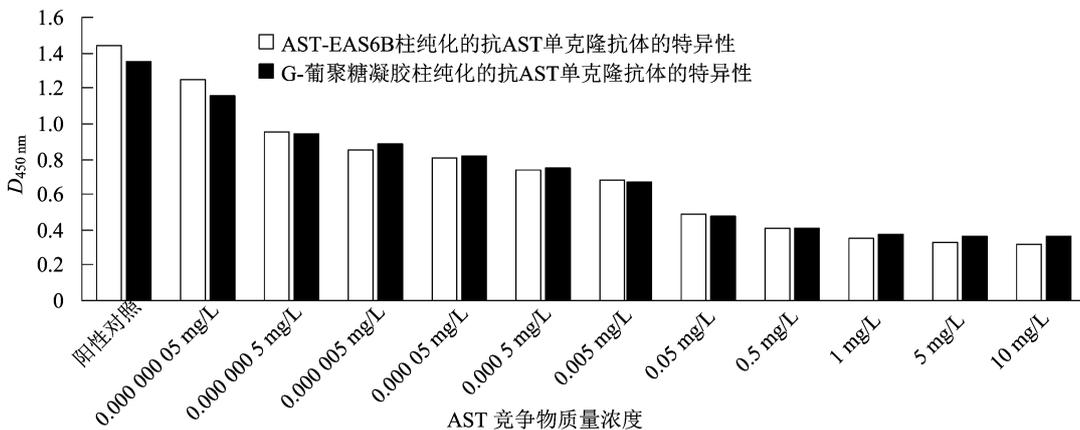


图 2 2 种方法纯化的单克隆抗体的特异性研究

3 讨论

在笔者之前的研究中, 从小鼠腹水中纯化抗

AST 单克隆抗体是用一些非特异性的方法, 如蛋白 G 的不同组合、离子交换和排阻色谱技术。这些用非特异性方法纯化的单克隆抗体对于现实的研究

表 2 2 种方法纯化的单克隆抗体的特异性

| AST 竞争物浓度 (mg/mL) | AST - EAS6B 柱纯化的抗 AST 单克隆抗体的特异性($D_{450\text{ nm}}$) | | | G - 葡聚糖凝胶柱纯化的抗 AST 单克隆抗体的特异性($D_{450\text{ nm}}$) | | |
|----------------------|-----------------------------------------------------------|-------|-------|--------------------------------------------------------|-------|-------|
| | 试样 1 | 试样 2 | 均值 | 试样 1 | 试样 2 | 均值 |
| 阳性对照 | 1.482 | 1.399 | 1.441 | 1.353 | 1.348 | 1.351 |
| 0.000 000 05 | 1.252 | 1.254 | 1.253 | 1.162 | 1.159 | 1.161 |
| 0.000 000 5 | 0.952 | 0.951 | 0.952 | 0.943 | 0.938 | 0.941 |
| 0.000 005 | 0.847 | 0.852 | 0.850 | 0.892 | 0.886 | 0.889 |
| 0.000 05 | 0.800 | 0.806 | 0.803 | 0.823 | 0.818 | 0.821 |
| 0.000 5 | 0.741 | 0.738 | 0.740 | 0.752 | 0.747 | 0.750 |
| 0.005 | 0.681 | 0.678 | 0.680 | 0.672 | 0.669 | 0.671 |
| 0.05 | 0.492 | 0.489 | 0.491 | 0.471 | 0.473 | 0.472 |
| 0.5 | 0.412 | 0.414 | 0.413 | 0.408 | 0.409 | 0.409 |
| 1 | 0.353 | 0.351 | 0.352 | 0.372 | 0.374 | 0.373 |
| 5 | 0.322 | 0.325 | 0.324 | 0.361 | 0.364 | 0.363 |
| 10 | 0.321 | 0.324 | 0.323 | 0.365 | 0.360 | 0.363 |

和应用来说不够灵敏,而且纯化耗时较长。当有足够量的抗原被固定时,能够提供较强的结合力,基于固定抗原的亲亲和层析技术是非常有效的^[11]。在本研究中,1 mL ESA6B 约耦合 1.35 mg AST,并且高的耦合速率确保了 AST - EAS6B 柱的强结合能力。当用 AST 与环氧活化琼脂糖 6B (EAS6B) 偶联制备的免疫亲和柱制备完成后,用该方法从小鼠腹水中纯化抗 AST 单克隆抗体能够获得高效价、高特异性的抗体。纯化抗 AST 单克隆抗体的结果表明,固定化 AST 亲和色谱可以选择性地捕获与 AST 特异结合的蛋白质,能够有效地完成变性抗体的排除和活性抗体的特异性捕获。本研究结果为进一步研究高灵敏度、高效价的抗 AST 单克隆抗体奠定了基础,如 ELISA 检测 AST 的定量检测方法的建立。此外,基于其选择性捕获与 AST 结合的蛋白的能力,固定化 AST 亲和层析可用于鉴定不同组织中的 AST 靶点^[12]。本研究还提供了 1 种制备具有类似活性基团的其他天然化合物的亲和层析树脂的方法。

参考文献:

- [1] Manfredi M, Severino M, Testi S, et al. Detection of specific IgE to quinolones[J]. *Journal of Allergy and Clinical Immunology*, 2004, 113(1): 155 - 160.
- [2] Craig A P, Franca A S, Oliveira L S, et al. Application of elastic net and infrared spectroscopy in the discrimination between defective and non - defective roasted coffees[J]. *Talanta*, 2014, 128: 393 - 400.
- [3] Dawes C C, Jewess P J, Murray D A. Thiophilic paramagnetic particles as a batch separation medium for the purification of antibodies from various source materials [J]. *Analytical*

- Biochemistry*, 2005, 338(2): 186 - 191.
- [4] El Khoury G, Lowe C R. A biomimetic protein G affinity adsorbent: an Ugi ligand for immunoglobulins and Fab fragments based on the third IgG - binding domain of protein G [J]. *Journal of Molecular Recognition*, 2013, 26(4): 190 - 200.
- [5] Handlogten M W, Stefanick J F, Alves N J, et al. Nonchromatographic affinity precipitation method for the purification of bivalently active pharmaceutical antibodies from biological fluids [J]. *Analytical Chemistry*, 2013, 85(10): 5271 - 5278.
- [6] 段立军, 孙博航. 黄芪甲苷的研究进展[J]. *沈阳药科大学学报*, 2011, 28(5): 410 - 416.
- [7] Yu S L, Ou - Yang Z, Xu J B, et al. Synthesis and evaluation of artificial antigens for astragaloside IV [J]. *Revista Brasileira de Farmacognosia*, 2014, 24(3): 282 - 287.
- [8] Li Y G, Chen Y Q, Li Z G, et al. Preparation and evaluation of a mixed - bed immunoaffinity column for selective purification of sixteen sulfonamides in pork muscle [J]. *Journal of Chromatographic Science*, 2012, 50(3): 167 - 174.
- [9] Xiong W, Huang W W, Jiao Y, et al. Production, purification and characterization of mouse monoclonal antibodies against human mitochondrial transcription termination factor 2 (MTERF2) [J]. *Protein Expression and Purification*, 2012, 82(1): 11 - 19.
- [10] Zhang Y R, Xin Y, Yang H L, et al. Novel affinity purification of xanthine oxidase from *Arthrobacter* M3 [J]. *Journal of Chromatography B*, 2012, 906: 19 - 24.
- [11] Ma F, Chen R, Zhang Z W, et al. Preparation of an immunoaffinity column with amino - silica gel microparticles and its application in sample cleanup for aflatoxin detection in agri - products [J]. *Molecules*, 2013, 18(2): 2222 - 2235.
- [12] Reiter E V, Cichna - Markl M, Tansakul N, et al. Sol - gel immunoaffinity chromatography for the clean up of ochratoxin A contaminated grains [J]. *Journal of Chromatography A*, 2011, 1218(42): 7627 - 7633.