

苦皮藤素V人工抗原的合成与鉴定^{*}

杨润亚^{1,2}, 祁志军¹, 吴文君^{1*}

(1 西北农林科技大学 农药研究所, 陕西 杨凌 712100; 2 烟台师范学院 生命科学院, 山东 烟台 264025)

[摘要] 采用琥珀酸酐法合成了苦皮藤素V的衍生物苦皮藤素V-半琥珀酸酯(CA-SG), 在此基础上, 分别采用混合酸酐法和碳化二亚胺法合成了苦皮藤素V的人工抗原(CA-BSA, CA-BSA 2), 采用紫外分光光度计法、SDS-PAGE及PAGE电泳法对合成的人工抗原进行了定性鉴定, 结果均表明人工抗原合成成功。根据半抗原、人工抗原及其载体在240 nm处的紫外吸光值, 计算出2种人工抗原中半抗原与载体的分子结合比率分别为11.6和10.7。

[关键词] 植物源农药; 苦皮藤素V; 半抗原; 人工抗原

[中图分类号] Q965.9

[文献标识码] A

[文章编号] 1671-9387(2004)06-0064-05

生物样品中痕量药物的分析方法是药物理论和应用研究的基础, 这对于农药同样适用。近年来, 利用抗原-抗体反应进行的免疫分析技术在痕量农药的检测方面得到了应用^[1~3]。国内外目前已开发出了40多种农药的免疫分析试剂盒, 但关于植物源农药的免疫分析技术国外仅有1例, 是有关尼鱼丁抗体制备的报道^[4], 而国内在该方面的研究尚属空白。作者首次对植物源农药活性化合物苦皮藤素V的免疫分析技术进行了探索性研究。

苦皮藤素V是从杀虫植物苦皮藤中分离出的一种具有杀虫活性的新型化合物, 分子式为 $C_{34}H_{46}O_{13}$, 结构式见图1。

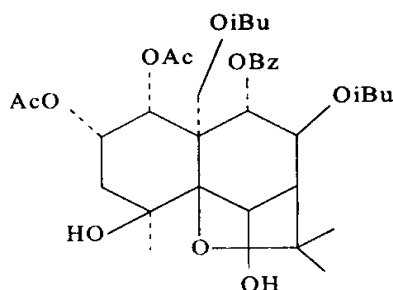


图1 苦皮藤素V的分子结构

Fig 1 Molecule structure of celangulin V

现已开发出了以苦皮藤素V为主要活性成分的生物合理农药“0.2%苦皮藤素乳油”^[5~7]。为了建立苦皮藤素V的免疫分析技术, 首先必须制备出其效价高、特异性强的抗体。由于苦皮藤素V为小分子化合物(相对分子质量为663), 本身不具有诱导产生

抗体的能力, 因此, 将其与大分子载体偶联制备出人工抗原, 则成为建立苦皮藤素V的免疫分析技术的前提和关键。本试验进行了苦皮藤素V人工抗原的合成及鉴定, 旨在建立苦皮藤素V的痕量检测方法, 以为其作用机理研究和残留、代谢等研究提供技术手段。

1 材料与方法

1.1 试剂和材料

苦皮藤素V, 纯度为97.4%, 由西北农林科技大学农药研究所提供; N-羟基琥珀酰亚胺(NHS), N,N-二环己碳二亚胺(DCC), 牛血清白蛋白(BSA), 氯甲酸异丁酯, 均为Sigma公司产品; 其他试剂均为分析纯。透析袋, 由上海进口分装。

1.2 用琥珀酸酐法合成苦皮藤素V-半琥珀酸酯

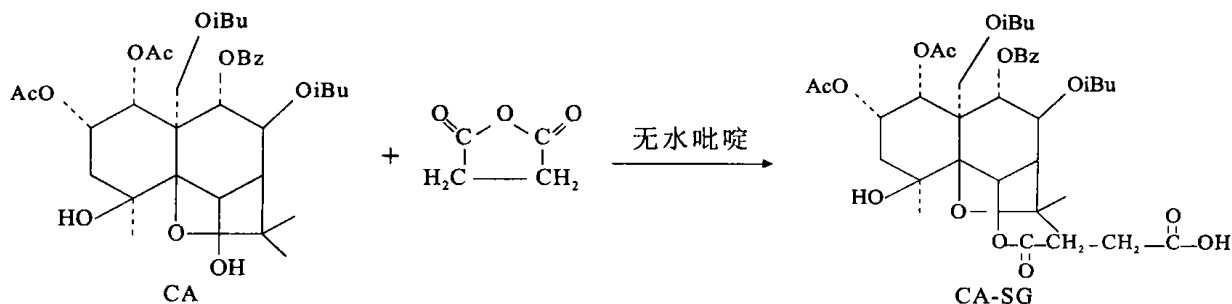
称取100 mg苦皮藤素V(CA)置于10 mL反应瓶中, 加入5 mL无水吡啶溶解, 再加入100 mg重结晶琥珀酸酐, 加热回流12 h。反应过程中采用TLC监测反应进程, 待苦皮藤素V基本反应完后停止反应。将反应混合物移至含冰蒸馏水45 mL和浓盐酸6 mL的混合液中, 此时有沉淀析出, 过滤分离沉淀, 再用蒸馏水洗沉淀至pH 5.0, 分离沉淀, 通风橱干燥后, 贮于干燥器中备用。合成产物经HPLC-MS及NMR进行结构鉴定, 记作CA-SG。该反应的反应方程式为:

* [收稿日期] 2003-05-19

[基金项目] 国家自然科学基金资助项目(30130130); 烟台师范学院中青年自然科学基金项目(000443)

[作者简介] 杨润亚(1974-), 女, 陕西蒲城人, 讲师, 博士, 主要从事农药毒理研究。E-mail: yry74@163.com

[通讯作者] 吴文君(1945-), 男, 四川洪雅人, 教授, 主要从事天然产物农药研究。E-mail: wuw enjun-1@163.com



1.3 苦皮藤素V人工抗原的合成

1.3.1 用混合酸酐法合成苦皮藤素V人工抗原

称取 45 mg CA-SG, 溶于 0.8 mL 二氧六环, 加入三正丁胺 13 μL 和氯甲酸异丁酯 7 μL , 10 搅拌 40 min, 此为反应液A; 另称取 BSA 180 mg, 溶于 5.5 mL 的 $V_{\text{水}}:V_{\text{二氧六环}}=10:1$ 的混合液中, 此为反应液B。将反应液B 置磁力搅拌器上, 在 4 $^{\circ}\text{C}$ 冰箱内将反应液A 滴加到反应液B 中, 继续搅拌 2 h, 用 1 mol/L NaOH 调节 pH 使之保持在 8.5, 再继续搅拌 3 h。最后将反应混合液装入透析袋中, 于蒸馏水中 4 $^{\circ}\text{C}$ 透析 3 d, 每 8 h 换水 1 次。将透析液冷冻干燥, 贮于 -20 $^{\circ}\text{C}$ 备用^[8]。

1.3.2 用碳化二亚胺法合成苦皮藤素V人工抗原

称取 45 mg 半抗原和 8 mg NHS 置于反应瓶中, 加 0.6 mL 无水二氧六环溶解。另取 12 mg DCC 溶于 0.4 mL 无水二氧六环, 加入反应瓶, 室温搅拌 5 h。反应完成后过滤除去二环己尿素, 上清液即为反应液A; 称取 BSA 160 mg 溶于 5.5 mL 的 $V_{\text{水}}:V_{\text{二氧六环}}=10:1$ 的混合液中, 此为反应液B。将反应液B 置于磁力搅拌器上, 在 4 $^{\circ}\text{C}$ 冰箱内将反应液A 滴加到反应液B 中, 4 $^{\circ}\text{C}$ 反应过夜。次日将反应液置于透析袋内, 于蒸馏水中 4 $^{\circ}\text{C}$ 透析 48 h, 每 8 h 换水 1 次。透析液冷冻干燥, 贮于 -20 $^{\circ}\text{C}$ 备用^[9]。

1.4 紫外分光光度计法鉴定人工抗原

将人工抗原、半抗原和载体蛋白配成 100 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 的溶液, 在 200~400 nm 分别扫描其紫外吸收, 根据扫描图谱进行偶联产物的鉴定。根据人工抗原和载体蛋白在 240 nm 处的紫外吸收值的变化, 及半抗原在该波长处的摩尔消光系数, 计算人工抗原中半抗原与载体的分子结合比率^[10]。

1.5 PAGE 和 SDS-PAGE 法鉴定人工抗原

采用常规电泳方法^[11], 其中分离胶浓度为 100 g/L, 浓缩胶浓度为 50 g/L, 点样量为 10 μL , 浓度 1 mg/mL。

2 结果与分析

2.1 苦皮藤素V-半琥珀酸酯的合成与鉴定

TLC 监测 (选择 $V_{\text{甲苯}}$ $V_{\text{乙酸乙酯}}$ $V_{\text{二氧六环}}=$

5:3:2 为展开剂) 结果表明, 在反应后生成了一个不同于反应物苦皮藤素V ($R_f=0.73$) 和琥珀酸酐 ($R_f=0.44$) 的新产物 CA-SG ($R_f=0.55$)。处理后共得产物 103 mg, 产率为 89.57%。比较产物与苦皮藤素V 的 HPLC-MS 及核磁共振图谱可知, 在 HPLC-MS 图中, 苦皮藤素V 的保留时间为 22.96 min, 其分子离子峰为 645.3, 推测产物为苦皮藤素V 裂解一个羟基后产生的 (662.3-17); CA-SG 的保留时间为 5.54 min, 其分子离子峰为 745.3, 认为是苦皮藤素V 与琥珀酸酐的反应物裂解一个羟基后产生的 (662.3+100-17)。因此初步认为, CA-SG 即为合成的目标产物。比较苦皮藤素V 与反应产物的 $^1\text{H-NMR}$ 可知, 在反应产物中, $\delta 4.9$ 处多出一个质子峰 (羧基质子), 在 $\delta 2.2$ 处减少了一个质子峰 (羟基质子), 说明苦皮藤素V 结构中一个游离的羟基已经被衍生为羧基了; 另外在 $\delta 2.75$ 处多出一组多重峰, 为 4 个质子, 说明是琥珀酸酐中的 2 个亚甲基质子。比较苦皮藤素V 与反应产物的 $^{13}\text{C-NMR}$ 可知, 反应产物中多出 $\delta 175.64$, 170.66, 29.49 和 28.38 共 4 条谱线, 其中 $\delta 175.64$ 和 170.66 为琥珀酸酐结构中的 2 个羰基碳原子, 而 $\delta 29.49$ 和 28.38 则为其中的 2 个亚甲基碳原子 (图略)。对以上谱图的差异分析表明, CA-SG 就是所要合成的目标结构, 即苦皮藤素V-半琥珀酸酯, 结构式见图 2。

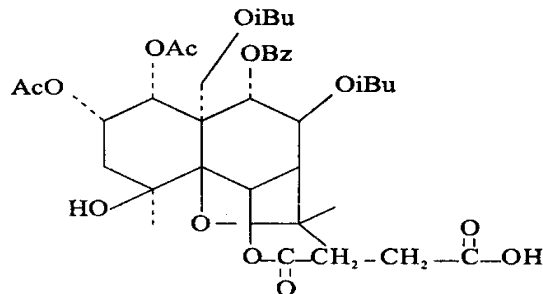


图2 苦皮藤素V-半琥珀酸酯结构式

Fig. 2 Molecule culture of celastrol V-semisuccinate

2.2 苦皮藤素V人工抗原的合成与鉴定

采用混合酸酐法合成人工抗原 145 mg, 记作 CA-BSA。采用碳化二亚胺法合成人工抗原 160 mg, 记作 CA-BSA 2。2 种人工抗原及其载体与半抗

原的紫外吸收图谱叠加后的结果见图 3 和图 4。由图 3、4 可以看出, 2 种方法合成的人工抗原的紫外吸收图谱与载体相比, 吸收曲线都发生了改变, 且都

是在半抗原的最大吸收范围内, 吸光值有所增加, 说明载体分子上已成功连接了一定数量的半抗原。

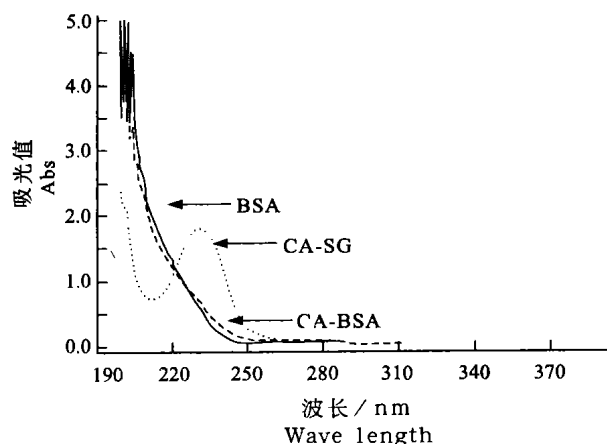


图 3 CA-BSA, BSA 及 CA-SG 的 UV 扫描图

Fig 3 UV spectrum of CA-BSA, BSA and CA-SG

根据人工抗原、载体及半抗原的紫外吸收曲线在 240 nm 处的摩尔吸收值, 计算出混合酸酐法和碳化二亚胺法合成的人工抗原中, 载体与半抗原的分子结合比率分别为 11.6 和 10.7。

2.3 人工抗原及其载体的 SDS-PAGE 和 PAGE 电泳

人工抗原及其载体的 SDS-PAGE (图 5) 电泳结果表明, 合成的人工抗原, 无论是 CA-BSA, CA-

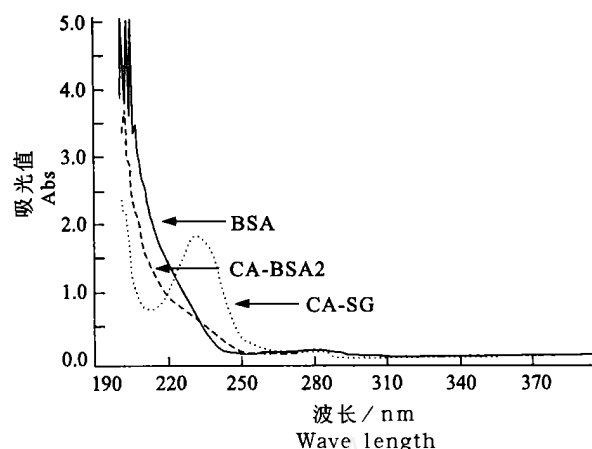


图 4 CA-BSA2, BSA 及 CA-SG 的 UV 扫描图

Fig 4 UV spectrum of CA-BSA2, BSA and CA-SG

OVA (为采用混合酸酐法合成的另一种人工抗原), 还是 CA-BSA2, 其 SDS-PAGE 电泳谱带的迁移率均比其各自载体的迁移率小, 表明人工抗原的分子质量均比其相应载体的分子质量大。分析认为, 这是由于载体经合成反应后连接上了一定数目的半抗原, 从而使得合成产物人工抗原的分子质量均比其相应载体的分子质量大。

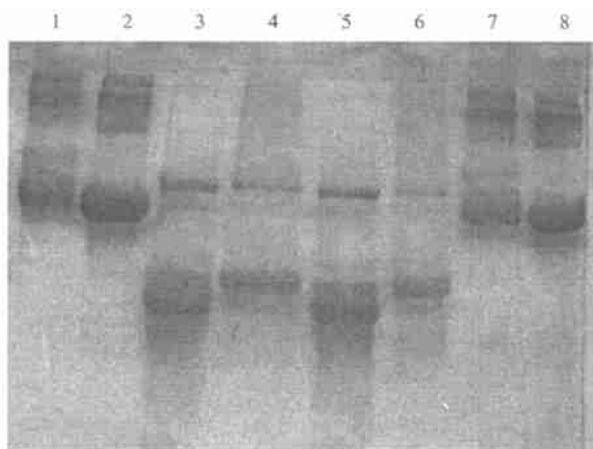


图 5 人工抗原及其载体的 SDS-PAGE 电泳结果

1 CA-BSA (混合酸酐法合成); 2 BSA; 3 OVA; 4 CA-OVA; 5 OVA; 6 CA-OVA; 7 CA-BSA2 (DCC 法合成); 8 BSA

Fig 5 SDS-PAGE electrophoresis of the artificial antigen and its carrier

1 CA-BSA (synthesized by mixed anhydride method); 2 BSA; 3 OVA; 4 CA-OVA; 5 OVA; 6 CA-OVA; 7 CA-BSA2 (synthesized by DCC method); 8 BSA

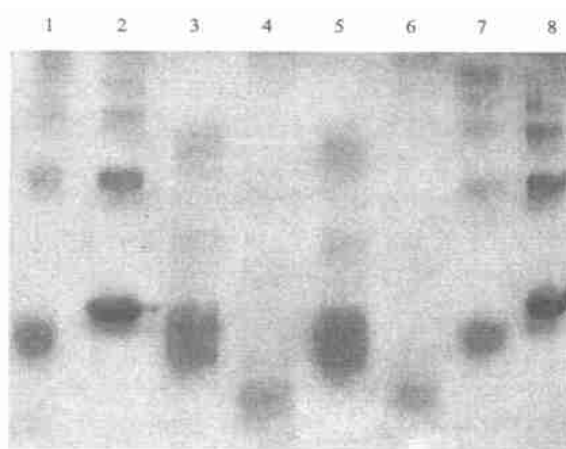


图 6 人工抗原及其载体的 PAGE 电泳结果

1 CA-BSA (混合酸酐法合成); 2 BSA; 3 OVA; 4 CA-OVA; 5 OVA; 6 CA-OVA; 7 CA-BSA2 (DCC 法合成); 8 BSA

Fig 6 PAGE electrophoresis of the artificial antigen and its carrier

1 CA-BSA (synthesized by mixed anhydride method); 2 BSA; 3 OVA; 4 CA-OVA; 5 OVA; 6 CA-OVA; 7 CA-BSA2 (synthesized by DCC method); 8 BSA

人工抗原及其载体的 PAGE 电泳结果(图 6)表明,合成的人工抗原的迁移率均比其各自载体的迁移率大。蛋白质在 PAGE 时,样品的迁移率取决于它所带净电荷的多少以及分子质量的大小。当样品由负极向正极移动时,带正电荷多的样品移动得慢,其迁移率小,带负电荷多的样品移动得快,其迁移率大;分子质量大的样品移动得慢,分子质量小的样品移动得快。由上述 SDS-PAGE 结果可知,合成的人工抗原比其载体的分子质量大,在不考虑电荷效应时,则其 PAGE 的迁移率要比其载体小;由于载体与半抗原反应时消耗了其分子外部的游离氨基,减少了载体的正电荷,而半抗原外部基团显中性,因而反应后合成的人工抗原与反应前的载体相比,正电荷有所减少;当进行 PAGE 时,在不考虑分子质量效应时,其迁移率将比其相应载体的大。将这两种情况综合考虑,则对载体而言,在进行 PAGE 时,若合成反应后增大的分子质量引起的效应强于反应中减少的正电荷引起的效应时,其迁移率将比反应后产物(即人工抗原)的迁移率大;若合成反应后增大的分子质量引起的效应弱于反应中减少的正电荷引起的效应时,其迁移率将比其反应产物(人工抗原)的迁移率小。由图 6 可知,在进行 PAGE 时,载体的迁移率比用其合成的相应人工抗原的迁移率小,分析认为在用载体进行人工抗原的合成后,其分子质量增大引起的效应弱于其正电荷减少引起的效应,故而在 PAGE 时迁移率变大。

上述 SDS-PAGE 和 PAGE 电泳结果表明人工抗原合成成功。

3 讨论

制备小分子化合物的人工抗原,需要与载体进行交联,但小分子化合物必须具有或衍生出能与载体进行交联反应的功能基团(氨基、羧基、重氮盐等),才能与载体交联。对含羟基的半抗原,需要将其羟基衍生为羧基后才能再与载体交联合成人工抗原。苦皮藤素 V 分子结构的外部基团中有 2 个羟基,但其中 4 位羟基由于空间阻碍作用较难反应,本试

验中主要是 6 位羟基与琥珀酸酐反应生成其衍生物苦皮藤素 V-半琥珀酸酯,从而在 6 位羟基上引入了一个羧基,进而与载体交联合成了苦皮藤素 V 的人工抗原。

对于含羧基的半抗原,其人工抗原的合成常采用混合酸酐法、活泼酯法或碳化二亚胺法。由于半抗原抗体的特异性不仅取决于半抗原整个分子或部分结构的性质,还与其人工抗原中载体上连接的半抗原数目有关,因此在免疫前,测定合成的人工抗原载体上连接的半抗原数目是非常必要和重要的。通常每一载体上含有 8~25 个半抗原时能得到效价较高的抗体^[12,13];也有研究认为,当半抗原与载体的偶联比为 3~45:1 时,免疫原性较强^[14]。本研究用混合酸酐法和碳化二亚胺法分别合成了苦皮藤素 V 的人工抗原,并根据 UV 吸光值计算出其分子中半抗原与载体的分子结合比率分别为 11.6 和 10.7,理论上应能得到效价较高的抗体,但尚需进一步证实。

人工抗原的鉴定有多种方法,如同位素标记的半抗原示踪法^[15,16];测定载体不具备紫外式可见光吸收基团,而半抗原具有紫外式可见光吸收基团的分光光度计法^[13,17,18];通过测定反应前后载体上游离氨基酸的数目变化值^[19],测定由人工抗原上非变性(构)解离下来的游离半抗原^[20,21],或测定载体没有而半抗原具有的特殊元素(P、X 等)^[19]和反应基团等,也可判断载体上是否连接上了半抗原。也有通过 SDS-PAGE 检测合成的人工抗原与其载体分子质量的差别^[22],或用其他电泳方法检测人工抗原与其载体电荷的变化^[23],来说明人工抗原的合成与否等。以上各种方法中,UV 或可见光分光光度计法最为简便易行,且消耗的样品量少,因而常被采用。本研究用 UV、SDS-PAGE 和 PAGE 3 种方法对人工抗原进行了鉴定,得出了一致的结果,均说明人工抗原合成成功,SDS-PAGE 证明了复合物分子质量的增加,而 PAGE 结果则说明了偶联反应后载体分子电荷的变化。

[参考文献]

- [1] Ferguson B S, Kelsey D E, Fan T S, et al. Pesticide testing by enzyme immunoassay at trace levels in environmental and agricultural samples[J]. Sci Total Environ, 1993, 132: 415-428
- [2] Kaufman B M, Clower M. Immunoassay of Pesticide: an update[J]. J AOAC Int, 1995, 78: 1079-1090
- [3] 吕康博. 农药及其代谢物的酶免疫分析技术[J]. 农药科学与管理, 2000, 21(5): 15-18

- [4] Andrew J Dinsmore, William Rees-Blanchard, Philip Behtley, et al Characterisation of antibody models of the ryanodine receptor for use in high-throughput screening[J]. Pestic Sci, 1998, 54: 345- 352
- [5] 吴文君. 杀虫植物苦皮藤研究[J]. 农药, 1991, 30(6): 13- 15
- [6] 吴文君, 刘惠霞, 朱靖博, 等. 天然产物杀虫剂- 原理·方法·实践[M]. 西安: 陕西科技出版社, 1998
- [7] 吴文君, 刘惠霞, 姬志勤, 等. 植物杀虫剂 0.2% 苦皮藤素乳油的研究与开发[J]. 农药, 2001, 40(3): 17- 19
- [8] Erlanger B F, Borek O F, Beiser S, et al Steroid-protein conjugates II: Preparation and characterization of conjugates of bovine serum albumin with progesterone, deoxycorticosterone and oestrone[J]. J Biol Chem, 1959, 243: 1090- 1094
- [9] Langone J J, Van Vunakis H. Radioimmunoassay for dieldrin and dldrin[J]. Res Commun Chem Pathol Pharmacol, 1975, 10: 163- 171
- [10] 陈新建. 免疫学技术在植物科学中的应用[M]. 北京: 中国农业大学出版社, 1998
- [11] Laemmli U K. Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4[J]. Nature, 1970, 227: 680- 685
- [12] Erlanger B F. The preparation of antigenic hapten-carrier conjugate: a survey[A]. Langone J J, Van Vunakis H. Methods in enzymology[C]. New York: Academic press, 1980 70- 74
- [13] Li Q X, Zhao M S, Gee S L, et al Development of enzyme-linked immunosorbent assays for 4-nitrophenol and substituted 4-nitrophenols[J]. J Agric Food Chem, 1991, 39: 1685- 1692
- [14] 赵肃清, 孙远明, 乐学义, 等. 农药人工抗原合成的研究进展[J]. 农药, 2002, 41(3): 9- 11
- [15] Faraj B A, Ali F M. Development and application of a radioimmunoassay for tetracycline[J]. J Pharmacol Exp Ther, 1981, 217: 10
- [16] Feng P C, Horton S R, Sharp C R. A general method for developing immunoassays to chloroacetamide herbicides[J]. J Agric Food Chem, 1992, 40: 211- 214
- [17] Buenafe A C, Rittenberg M B. Combining site specificity of monoclonal antibodies to the organophosphate hapten soman[J]. Mol Immunol, 1987, 24: 401- 407
- [18] McAdam D P, Hill A S, Beasley H L, et al Mono- and polyclonal antibodies to the organophosphate fenitrothion. 1. Approaches to hapten-protein conjugation[J]. J Agric Food Chem, 1992, 40: 1466- 1470
- [19] Queffelec Anne-Laurence, Nodet P, Haelters Jean-Pierre, et al Hapten synthesis for a monoclonal antibody based ELISA for Deltamethrin[J]. J Agric Food Chem, 1998, 46: 1670- 1676
- [20] Sawada J I, Janeja N, Nagamatsu K, et al Production and characterization of high-affinity monoclonal antibodies against morphine[J]. Mol Immunol, 1991, 25: 937- 943
- [21] Wainer B H, Fitch F W, Rothberg R M, et al Morphine-3-succinyl-bovine serum albumin: an immunogenic hapten-protein conjugate[J]. Science, 1972, 176: 1143- 1145
- [22] Wetzel R, Hulualani R, Stults J T, et al A general method for highly selective cross-linking of unprotected polypeptides via pH-controlled modification of N-terminal α -amino groups[J]. Bioconjug Chem, 1990, 1: 114- 122
- [23] Kamps-Holtzapfel C, Carlin R J, Sheffield C, et al Analysis of hapten-carrier protein conjugates by nondenaturing gel electrophoresis[J]. J Immunological Methods, 1993, 164: 245- 253

Synthesis and characterization of artificial antigen of Celangulin V

YANG Run-ya^{1,2}, QI Zhi-jun¹, WU Wen-jun¹

(1 Institute of Pesticide, Northwest Sci-Tech University of Agriculture and Forestry, Yangling, Shaanxi 712100, China;

2 College of Life Science, Yantai Normal University, Yantai, Shandong 264025, China)

Abstract: The primarily study on the immunoassay of Celangulin V, one kind of insecticidal compound from plants, was carried out. Firstly, the derivative of Celangulin V, called as CA-SG, was synthesized by succinic anhydride method; Then, two artificial antigen of Celangulin V-CA-BSA and CA-BSA 2 were prepared by mixed anhydride method and carbodiimide method respectively. The characterization of hapten-protein conjugates were examined by three methods, ultraviolet spectrophotometry, sodium dodecyl sulfate-polyacrylamide gel electrophoresis and polyacrylamide gel electrophoresis respectively. The number of hapten molecules per molecule of protein estimated by ultraviolet spectrophotometry according to the density of compounds at 240 nm for two conjugates were 11.6 and 10.7 respectively.

Key words: botanical pesticide; Celangulin V; hapten artificial antigen