

SW 人工抗原的合成与鉴定

王爱华^a, 宋毓民^a, 周 乐^b, 王建华^a

(西北农林科技大学 ^a 动物医学院, ^b 理学院, 陕西 杨凌 712100)

[摘 要] **【目的】**探索高效苦马豆素(SW)人工抗原 SW-BSA 的合成方法。**【方法】**设计新的技术路线,合成 SW 人工抗原制备的关键中间产物 SW-对甲基苯甲酸,并进行波谱分析。应用 EDC 法将 SW-对甲基苯甲酸分别与牛血清白蛋白(BSA)和卵清蛋白(OVA)连接,制备免疫抗原 SW-BSA 和包被抗原 SW-OVA,通过小鼠免疫试验检测所合成的 SW-BSA 的免疫原性。**【结果】**合成的 SW-对甲基苯甲酸的结构与预期目标产物一致;合成的 SW-BSA 可刺激小鼠产生针对 SW 的抗体;通过薄层层析技术可对反应进程进行即时检测。**【结论】**SW-BSA 人工抗原合成成功,该人工抗原具有良好的免疫原性。

[关键词] 苦马豆素;人工抗原;免疫原性

[中图分类号] S859.8 **[文献标识码]** A **[文章编号]** 1671-9387(2008)03-0080-05

Synthesis and Identification of SW Artificial Antigen

WANG Ai-hua^a, SONG Yu-min^a, ZHOU Le^b, WANG Jian-hua^a

(*a. College of Veterinary Medicine, b. College of Science, Northwest A & F University, Yangling, Shaanxi 712100, China*)

Abstract:**【Objective】**The study was to search for an efficient SW-BSA method to synthesize the SW artificial antigen.**【Mehtod】**A new synthetic route was used to synthesize the key intermediate product, SW-4-methylbenzonic acid, then it was coupled with BSA or OVA by EDC · HCl to produce SW-BSA and SW-OVA, the immunogenicity of the SW-BSA was determined by inoculating the mice.**【Result】**The key intermediate product, SW-4-methylbenzonic acid, was synthesized successfully. The spectral analysis of structure verified that it was absolutely coincident with that deduced theoretically with the right molecular weight. The immunologic tests showed that the serum antibody against SW in inoculated mice were high, indicating the satisfactory immunogenicity of the SW artificial antigen.**【Conclusion】**The results indicated that new synthesis route was practical and efficient for synthesis of SW-BSA, which had a favorable immunogenicity.

Key words: swainsonine; artificial antigen; immunogenicity

苦马豆素(Swainsonine, SW)属于吡咯兹啉类生物碱,相对分子质量为 173 u,是疯草(Locoweed)类植物引起马、牛、羊等动物中毒的主要有毒成分^[1-5]。疯草危害面积大,蔓延后可促使草场退化、利用率下降,给草原畜牧业造成巨大的经济损失。但营养学研究发现,疯草粗蛋白含量高达 11%~12%,有着被作为优良饲草的潜力。另外,有研究表明,SW 具有显著的抗癌作用^[6-9]。因此,如何预防

* [收稿日期] 2007-11-29
[基金项目] 国家自然科学基金(30571315);博士点基金(20030712017)
[作者简介] 王爱华(1966—),女,陕西合阳人,副教授,在读博士,主要从事动物微生物学与免疫学研究。
E-mail: wangaihua@nwsuaf.edu.cn
[通讯作者] 王建华(1948—),男,河南南阳人,教授,博士生导师,主要从事动物中毒性及营养代谢性疾病研究。
E-mail: jhwang1948@sina.com

动物疯草中毒并合理利用疯草这一资源成为目前研究的热点。近年来的研究证明,通过化学方法将牛血清白蛋白(BSA)与SW偶联制备的人工抗原SW-BSA具有一定的免疫原性^[10-11],为解决上述热点问题提供了新的途径与希望。但目前建立的SW-BSA制备方法程序繁琐,反应过程监测困难,合成成本高,限制了其在实际生产中的应用。可见,建立新的简便易行的SW-BSA合成方法意义重大。本研究通过新的技术路线,建立了程序简单、过程易于控制和监测的SW-BSA合成方法,其所制备的目的抗原免疫原性好、特异性强,为SW的进一步研究和应用奠定基础,现将结果报道如下。

1 材料与方法

1.1 材料

1.1.1 试验动物 Balb/c 小鼠,6~8 周龄,18~20 g,购于第四军医大学实验动物中心,常规饲养。

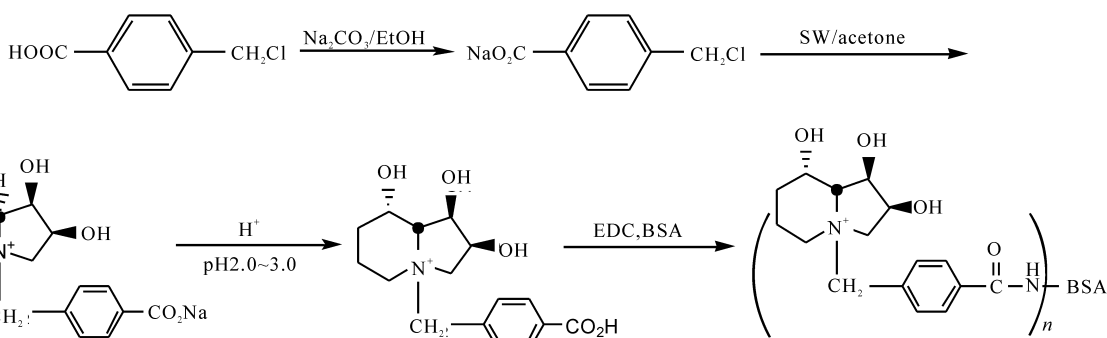


图1 SW-BSA人工抗原的合成技术路线

Fig. 1 Synthetic routine of SW-BSA

1.2.1 对氯甲基苯甲酸钠的合成与纯化 称取对氯甲基苯甲酸 2.56 g,溶于 5 mL 水和 5 mL 无水乙醇混合液,加热助溶。另取 Na₂CO₃ 0.8 g,加 5 mL 水溶解。将 2 种溶液混合,56 ℃ 水浴中反应,薄板层析检测,待反应完全后,薄膜蒸发仪蒸干溶剂,加少量甲醇加热溶解之后,再加入适量氯仿结晶,室温放置过夜,次日过滤,收集结晶产物,即得对氯甲基苯甲酸钠。

1.2.2 SW-对甲基苯甲酸的合成 称取 SW 17.3 mg (0.1 mmol),在无水乙醇中完全溶解后,加入 2 倍量对氯甲基苯甲酸钠,50~56 ℃ 回流反应约 1 h,蒸干溶剂。残留物用适量无水丙酮溶解,加入少量碘化钠继续于 50~56 ℃ 回流反应,间隔 30~60 min 取样,薄板层析检测,在 V(氯仿):V(乙醇)=5:2 的展开剂中展开,在 254 nm 紫外光下检测,之后参

1.1.2 试剂及仪器 苦马豆素(SW),由西北农林科技大学生物毒素与分子毒理学研究室提供,纯度 70%;牛血清白蛋白(BSA)、卵清白蛋白(OVA),均为 sigma 公司产品;对氯甲基苯甲酸,纯度 99%,购自青岛三力化工技术有限公司;1-(3-二甲氨基丙基)-3-乙基碳二亚胺盐酸盐(EDC·HCl),购自吉尔生化(上海)有限公司;弗氏完全佐剂、弗氏不完全佐剂,参照文献[12]自制;酶标山羊抗小鼠 IgG 抗体,购自北京鼎国生物技术有限责任公司;3,3',5,5'-四甲基联苯胺(TMB),为 Amresco 公司产品;其他试剂均为进口或国产分析纯。Mutiskan MK3 酶标仪,热电(上海)仪器有限公司生产;酶标板为 Costor 公司产品。

1.2 SW-BSA 人工抗原的合成

按照图 1 所示技术路线合成 SW-BSA 人工抗原。

照文献[10]的方法进行 SW 显色试验。待体系中 SW 完全反应后,加入 HCl,调 pH 2~3,用薄膜蒸发仪蒸干溶剂,残留物用无水丙酮溶解,双层滤纸过滤,除去大部分不溶物(NaCl)。滤液中加入适量硅胶,待溶剂自然蒸干后,干法过凝胶柱,依次用氯仿、氯仿-乙醇、乙醇洗柱,回收目标产物,真空干燥即得 SW-甲基苯甲酸。对 SW-甲基苯甲酸进行波谱分析,并与文献[13-15]比对,分析其结构。按下式计算产率(γ):

$$\gamma = \text{SW-对甲基苯甲酸质量}(\text{mg}) / 30.8 \times 100\%$$

1.2.3 SW-BSA 人工抗原的合成 取 BSA 2.0 mg,SW-甲基苯甲酸 2.0 mg,分别溶于 10.0 mL 蒸馏水后混合。另取 EDC·HCl 100 mg,溶于 10 mL pH6.4 的 PBS 液,逐滴加入上述混合液,35 ℃ 水浴反应 30 min。反应结束后,将反应液上葡聚糖凝胶

柱(LH20),用蒸馏水洗脱,以 10 g/L 磺基水杨酸溶液检测蛋白,分步收集。将含有蛋白的溶液合并,装入透析袋,用 PEG6000 浓缩除去多余水分,冻干,即为 SW-BSA 人工抗原,按 SW-BSA/(BSA+SW-甲基苯甲酸)计算产率。

1.3 小鼠免疫试验

称取 SW-BSA 冻干粉 0.5 mg,溶于 0.5 mL 生理盐水中,加入等体积的弗氏佐剂(初次免疫用弗氏完全佐剂,加强免疫用弗氏不完全佐剂),用微量混匀器充分混匀并使混合液充分乳化,用于小鼠免疫。

取小鼠 5 只,用上述制备的 SW-BSA 抗原进行免疫,每只颈背部分 3 点皮下注射,免疫剂量为 0.2 mL/只,间隔 2 周同剂量加强免疫 1 次,共免疫 3 次。另取 1 只小鼠注射相同剂量 PBS 作为阴性对照。第 3 次免疫 1 周后,每只小鼠断尾采血,分离血清,测定抗体效价。

1.4 小鼠血清抗体效价的测定

用与 1.2.3 相同的方法制备 SW-OVA,作为包被抗原,间接 ELISA 法测定小鼠血清抗体效价。ELISA 测定的主要程序是:取酶标板,各孔加入 1 $\mu\text{g/mL}$ SW-OVA 碳酸缓冲液,4 $^{\circ}\text{C}$ 包被过夜,0.05 mol/L 的 PBS-T 缓冲液洗板(以下简称洗板);之后用 15 g/L 明胶 37 $^{\circ}\text{C}$ 封闭 1 h,洗板;加入二抗(辣根过氧化物酶标记羊抗鼠 IgG,1:2000),于 37 $^{\circ}\text{C}$ 作用 1 h,洗板;最后加入 10 g/L TMB 显色,2 mol/L 的 H_2SO_4 终止反应,测定 OD_{450} ,每组设 3 个重复孔,计算其平均值,以待测孔 OD_{450} /阴性对照 OD_{450} 值大于 2($\text{P/N}>2$)判为阳性。

2 结果与分析

2.1 SW-对甲基苯甲酸的检测与结构分析

SW 与对氯甲基苯甲酸钠反应 30 min 后即有季铵盐产物形成,此季铵盐产物和对氯甲基苯甲酸钠在 254 nm 紫外光下均显荧光,应用 SW 显色试验检测,目标产物与 SW 的显色特性一致(呈蓝色),其 R_f 值(0.179)小于 SW(0.45)。随着反应时间的延长,反应体系中出现另一种与目标物具有相同显色特性的反应产物,在上述展开体系中位于原点。此 2 种产物经凝胶柱层析纯化,真空干燥后均为白色或略带黄色粉末状物,具有很强的吸水性,在转化为 SW-对甲基苯甲酸后,分别以薄板层析检测,表现出相同的性质, R_f 值均为 0.179,合并后称重,其总产率为 67%。

波谱测定结果显示,目标产物相对分子质量为

308 u,其结构与预期目的物的理论结构一致。波谱分析数据如下:ESI MS m/z 308 $[\text{M}^+]$. ^{13}C NMR (125 Hz, acetone- d_6 + CD_3OD): δ 134.0 (C-2'), 131.3(C-3'),100.8(C-1',C-4'),77.2(C-8a),71.6 (C-2),69.3(C-1),68.7(C-3),65.4(C-8),65.0(C-9),59.0(C-5),28.2(C-7),16.5(C-6). ^1H NMR (400 MHz, acetone- d_6 + CD_3OD): δ 8.13(d, J = 7.42 Hz, 2H, H-3'), 7.78(d, J = 7.68Hz, 2H, H-2'),5.19(d, J = 13.2Hz, 1H, H-9a),4.78(d, J = 13.2 Hz, 1H, H-9b),4.63(t, J = 6.0 Hz, 1H, H-1),4.51(brs, 1H, H-2),4.44(m, 1H, H-8),4.10(dd, J = 8.0, 12.4 Hz, 1H, H-8a),4.02(d, J = 5.6 Hz, 1H, H-3a),3.47(d, J = 12.8 Hz, 1H, H-3b),3.24(m, 2H, H-5),2.49(m, 1H, H-6a),2.33(m, 1H, H-6b),1.95(d, J = 13.2 Hz, H-7a),1.81(m, 1H, H-7b)。

2.2 SW-BSA 的合成

合成的 SW-BSA 经葡聚糖凝胶柱纯化,冻干后呈白色针状结晶,产率为 86%。

2.3 SW-BSA 的免疫效果

间接 ELISA 检测结果(表 1)显示,免疫的 5 只小鼠血清抗 SW 抗体均为阳性,表明合成的抗原能够刺激小鼠产生抗 SW 的特异抗体,具有良好的免疫原性。

表 1 小鼠血清 SW 抗体的检测结果
Table 1 Antibody against SW in serum of mice by ELISA

血清 Serum of the mice	OD 平均值 Mean value of OD	P/N
阴性对照 Negative control	0.020 $\pm$ 0.001	—
1	0.131 $\pm$ 0.007	6.55
2	0.157 $\pm$ 0.015	7.85
3	0.091 $\pm$ 0.006	4.55
4	0.226 $\pm$ 0.026	11.3
5	0.250 $\pm$ 0.007	12.5

3 讨论

疯草是广泛分布于我国西部草地的主要毒草,动物采食后可引起中毒甚至死亡。但是,疯草又是可利用的牧草资源,富含蛋白质、微量元素等营养成分,亦可能成为优质牧草,同时其在防风固沙,保护草场方面具有一定的优势^[1-5]。另外,近年来的研究证明,其主要有毒成分 SW 具有抗癌作用^[6-9]。因此,如何在保护家畜免受毒害的同时,有效利用疯草这一资源受到广泛的关注。免疫预防措施的提出为合理解决防除与保护的矛盾提供了新的希望,但因

为SW的相对分子质量仅为173 u,为半抗原物质,必须与载体结合后使之成为人工完全抗原,才能刺激机体产生抗体,达到免疫的效果。童德文^[10]和董强等^[11]通过用溴乙酸制备的活性酯与苦马豆素反应形成SW活性酯,再与BSA偶联获得SW-BSA抗原,取得了良好的效果,但该方法需要多步反应和纯化,各步的反应产物均需要进行结构分析,以判定反应产物的正确性,反应过程中无法进行有效的监控。本研究依据芳香基团在紫外光下可显示荧光这一特点,采用新的合成路线,将对氯甲基苯甲酸钠与SW反应,产物可在紫外光下显示荧光,并具有SW的显色特性,而对氯甲基苯甲酸钠不具有SW的显色特性,SW在紫外光下不显荧光。因而,该方法可通过薄层层析,应用紫外光检测及SW的显色特性,可对反应进程进行即时检测,无需特殊设备的要求,使合成的程序大大简化。

由于SW没有直接与BSA等蛋白载体偶联的活性基团,不能直接与BSA等载体蛋白偶联,因而合成SW-BSA的关键在于给SW分子结构中加入一个能与BSA蛋白偶联的"臂",同时又不能损害SW的活性基团,这成为SW人工抗原合成的关键和难点。已有的研究均是通过用溴乙酸制备的活性酯与苦马豆素反应形成SW活性酯^[10-11]。本研究在合成SW-BSA时,先合成对氯甲基苯甲酸钠,该步为酸碱反应,因而反应快速而且容易,有效地保护了其中的羧基;然后对氯甲基苯甲酸钠直接与SW反应,反应体系中加入适量NaI作为催化剂,加快了反应速度,使反应条件变得温和,合成过程中的副产物显著减少。

SW具有多个手性元素^[13-14],推测合成的SW季铵盐可能存在同分异构体。本研究在SW与对氯甲基苯甲酸钠反应体系中,通过薄层层析可检测到2种既具有SW显色特性,又能在254 nm紫外光下显示荧光的产物,两者的极性存在一定差异,但经过纯化并进一步转为SW-对甲基苯甲酸后,则在薄层层析检测中显示同一特性。应用ChemDraw Ultru 8.0软件分析,认为可能是由于SW结构中手性N元素的存在所引起。有关2种产物的稳定性,有待于今后进一步研究。

人工抗原能否刺激动物产生针对半抗原的特异性抗体,是判断人工抗原合成成败的核心^[12]。本研究小鼠免疫试验结果显示,所合成的SW人工抗原能有效刺激小鼠机体发生免疫应答,产生针对SW的特异性抗体,证明所制备的SW-BSA具有良好的

免疫原性,与董强^[11]等的结果一致。

SW为生物碱,分子量小,给抗SW抗体的检测造成困难,前期的研究中曾应用间接血凝试验^[9]等方法进行测定,其结果均不能满足分析的要求。有人以SW作为包被抗原进行检测^[10],但酶标板对生物碱的结合性较差,有可能造成测定的误差。本研究以SW-OVA作为包被抗原,建立了SW抗体的ELISA测定方法,由于BSA和OVA之间无抗原交叉性^[12,16],提高了检测的特异性和准确性,为SW抗体的检测提供了良好的方法。

【参考文献】

- [1] 王建华. 动物中毒病及毒理学[M]. 2版. 台湾:台湾中草药杂志社,2002.
Wang J H. Toxicopathy and toxicology in animal [M]. 2nd Edition. Taiwan: Taiwan Chinese Herbal Medicine Journal Publishing House, 2002. (in Chinese)
- [2] Isis M H, Jose' L G, Mitsue H, et al. Assessment of the perinatal effects of maternal ingestion of Ipomoea carnea in rats [J]. Experimental and Toxicologic Pathology, 2007, 58: 439-446.
- [3] Pfister J A, Astorga J B, Panter K E, et al. Maternal ingestion of locoweed I. Effects on ewe-lamb bonding and behaviour [J]. Small Ruminant Research, 2006, 65: 51-63.
- [4] Astorga J B, Pfister J A, Stegelmeier B L, et al. Maternal ingestion of locoweed II. The ability of intoxicated ewes to discriminate their own lamb [J]. Small Ruminant Research, 2006, 65: 64-69.
- [5] Pfister J A, Davidson T W, Panter K E, et al. Maternal ingestion of locoweed III. Effects on lamb behaviour at birth [J]. Small Ruminant Research, 2006, 65: 70-78.
- [6] Sun J Y, Zhu M Z, Wang S W, et al. Inhibition of the growth of human gastric carcinoma *in vivo* and *in vitro* by swainsonine [J]. Phytomedicine, 2007, 14: 353-359.
- [7] Oladipo A O, Paulette M F, Ibrahim L, et al. Enhanced proliferation of functionally competent bone marrow cells in different strains of mice treated with swainsonine [J]. International Immunopharmacology, 2003, 3: 445-455.
- [8] Oladipo A O, Paulette M F, Ibrahim L, et al. Limits of stimulation of proliferation and differentiation of bone marrow cells of mice treated with swainsonine [J]. International Immunopharmacology, 2003, 3: 1537-1547.
- [9] Masahiro M, Junichi T, Michiko N F, et al. Suppressive effects of swainsonine and N-butyldeoxynojirimycin on human bone marrow neutrophil maturation [J]. Biochemical and Biophysical Research Communications, 2000, 269: 219-225.
- [10] 童德文. 苦马豆素-BSA的合成及其免疫原性研究[D]. 陕西杨凌:西北农林科技大学, 2000.
Tong D W. Studies on synthesis of swainsonine-BSA and its immunogenicity [D]. Yangling, Shaanxi: Northwest A & F University, 2000. (in Chinese)

[11] 董 强,童德文,付广建,等. 苦马豆素人工抗原免疫山羊的安全性试验 [J]. 中国畜牧杂志,2005,41(5):18-20.
Dong Q,Tong D W,Fu G J,et al. Safety evaluation of artificial antigen for swainsonine in immunized goats [J]. Chinese Journal of Animal Science,2005,41(5):18-20. (in Chinese)

[12] 沈关心,周汝麟. 现代免疫学实验技术 [M]. 武汉:湖北科技出版社,1998.
Shen G X,Zhou R L. The Morden techonogy of immunological expriment [M]. Wuhan: Hubei Science and Technology Publishing House,1998. (in Chinese)

[13] Nag S K,Mario P B. Synthesis of thioswainsonine as a potential glycosidase inhibitor [J]. Carbohydrate Research,2006,341: 1685-1691.

[14] Ahmed E N. Synthetic methods for the stereoisomers of swainsonine and its analogues [J]. Tetrahedron,2000,56: 8579-8629.

[15] Gerrrs H,Dirk R,Oliver R. Stereoselective synthesis of swainsonines from pyridines [J]. Tetrahedron,2005,61:643-655.

[16] 李方实,孙 峰,刘贤进,等. 抗异丙隆多克隆抗体的研制 [J]. 中国农业科学,2007,40(2):298-303.
Li F S,Sun F,Liu X J,et al. Development of anti-isoproturon polyclonal antibody [J]. Scientia Agricultura Sinica,2007,40(2):298-303. (in Chinese)

(上接第 79 页)

本试验将 PCV2 的 *ORF1*、*ORF2* 基因串联重组入腺病毒表达载体,并在 293 细胞中包装成为完整的腺病毒。由于所选用的腺病毒表达载体已经进行了人工改造,使其缺失了 E1(复制相关基因)和 E3(毒性基因)基因,故而该载体在安全性方面具有明显的优势。本研究成功地构建了含有 PCV2 *ORF1*、*ORF2* 基因的重组腺病毒,小鼠免疫试验证实该重组腺病毒能诱导机体产生针对 PCV2 的特异性抗体,为 PCV2 基因工程疫苗的研制和 PCV2 感染的综合防制奠定了基础。

[参考文献]

[1] John C,Harding S. The clinical expression and emergence of porcine circovirus2 [J]. Veterinary microbiology,2003,131(35):131-135.

[2] Allan G M,Joun A. Porcine circovirus;a reviw [J]. J Vet Diagn Invest,2000,12:3-14.

[3] Liu Q,Wang L,Willson P,et al. Seroprevalence of porcine circovirus type 2 in swine populations in Canada and Costa Rica [J]. Can J Vet Res,2002,66(4):225-31

[4] Yu S,Oppressing T,Kitikoon P,et al. Porcine circovirus type 2 (PCV2) distribution and replication in tissues and immune cells in early infected pigs [J]. Veterinary immunology and im-

munopathology,2007,367:473-487.

[5] 萨姆布鲁克 J,弗里奇 E F,曼尼阿蒂斯 T. 分子克隆实验指南 [M]. 2 版. 金冬雁,黎孟枫,侯云德,等译. 第 2 版. 北京:科学出版社,2000.
Sambrook J ,Fritsch E F,Maniatis T. Molecular Cloning :A Laboratory Manual [M]. 2nd. Translated by J in D Y,Li M F,Hou Y D,et al. Beijing:Science Press,2000. (in Chinese)

[6] Ju C M,Fan H Y,Tan Y D,et al. Immunogenicity of a recombinant pseudorabies virus expressing ORF1-ORF2 fusion protein of porcine circovirus type 2 [J]. Veterinary microbiology,2005,109:179-190.

[7] Wu Q,Brum M C,Caron L,et al. Adenovirus-mediated type I interferon expression delays and reduces disease signs in cattle challenged with foot-and-mouth disease virus [J]. Interferon Cytokine Res,2003,23(7):359-368.

[8] Jung K,Kim J,Ha Y,et al. The effects of transplacental porcine circovirus type 2 infection on porcine epidemic diarrhoea virus-induced enteritis in preweaning piglets [J]. The Veterinary Journal,2006,171:445-450.

[9] Andrew K C. Transcriptional analysis of porcine circovirus type 2 [J]. Virology,2003,305(1):168-180.

[10] Steinfeldt T,Finsterbusch T,Mankertz . A Rep and Rep' protein of porcine circovirus type 1 bind to the origin of replication in vitro [J]. Virology,2001,291(1):152-160.