

罗汉果甜苷 V 特异性抗血清的制备与应用

李丽, 李勇文, 段小群*, 陈旭, 杨新平, 梁成钦, 卢曦, 曾建红(桂林医学院, 广西 桂林 541004)

摘要: 目的 制备罗汉果甜苷 V(MogV)特异性抗血清, 建立 MogV 含量竞争性抑制酶联免疫检测法。方法 用罗汉果甜苷 V-丁二酸酯-牛血清蛋白(MogV-HS-BSA)结合比约为 44:1 为免疫抗原制备抗血清, 用罗汉果甜苷 V-丁二酸酯-人血清蛋白(MogV-HS-HSA)结合比约为 64:1 为包被抗原, 建立 MogV 含量竞争性抑制酶联免疫检测法。结果 包被抗原工作浓度为 $1 \mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$, 血清最佳稀释倍数为 1:8 000, 在此工作浓度下, MogV 浓度在 $1\times 10^{-4}\sim 1 \mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$ 内回归方程 $Y=-0.158X+0.298$, $r=0.991 0$ 。结论 成功制备了 MogV 抗血清, MogV 浓度在 $1\times 10^{-4}\sim 1 \mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$ 内对抗血清的 OD(405 nm)值抑制作用呈良好的线性关系。

关键词: 罗汉果甜苷 V; 特异性抗血清; 制备; 竞争抑制

中图分类号: R965.2

文献标志码: B

文章编号: 1007-7693(2012)07-0632-03

Preparation of Mogrosides V-specific Antiserum and Its Application

LI Li, LI Yongwen, DUAN Xiaoqun*, CHEN Xu, YANG Xingping, LIANG Chengqin, LU Xi, ZENG Jianhong(Guilin Medical University, Guilin 541004, China)

ABSTRACT: OBJECTIVE To prepare mogrosides V (MogV) specific antiserum and establish the competitive-inhibitive ELISA method to detect MogV content. **METHODS** Antiserum was prepared with the V-Mogrosides succinate-bovine serum albumin(MogV-HS-BSA) as the immunogen (ratio about 44:1), the competitive inhibition ELISA method for MogV content was established with the V-Mogrosides succinate-human serum protein (MogV-HS-HSA) with a ratio of about 64:1 as coating antigens. **RESULTS** The coating antigen working concentration was $1 \mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$, the best serum dilution is 1:8 000. Within MogV concentration $1\times 10^{-4}\sim 1 \mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$, the regression equation was $Y=-0.158X+0.298$, $r=0.991 0$. **CONCLUSION** MogV anti-serum is successfully prepared. Within $1\times 10^{-4}\sim 1 \mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$, the MogV concentration and OD value(405 nm) of the antiserum shows a good linear relationship.

KEY WORDS: mogrosides V; specific antiserum; preparation; competitive inhibition

罗汉果为葫芦科植物罗汉果 *Momordica grosvenori* Swingle 的干燥果实, 性凉、味甘, 清热润肺, 滑肠通便, 用于肺火燥咳, 咽痛失音, 肠燥便秘^[1-2]。罗汉果的主要活性成分罗汉果甜苷为非糖甜味物质, 属葫芦素烷型三萜皂苷类化合物^[3]。现已被提取为天然甜味剂, 并已投入工业生产。其中罗汉果甜苷 V(Mogroside V, MogV)是甜苷中的主要甜味成分, 占总甜苷量的 30%~40%, 其甜味比蔗糖甜 300 多倍^[4]。目前在产品标准中已经开始以 MogV 作为定量指标, 国际市场上通常要求罗汉果甜苷产品的 MogV $\geq 30\%$ 。本实验用结合比约为 44:1 的罗汉果甜苷 V-丁二酸酯-牛血清

蛋白(MogV-HS-BSA)为免疫抗原^[5](制备方法另文报道), 免疫 BALB/c 小鼠制备抗血清, 用结合比约为 64:1 的罗汉果甜苷 V-丁二酸酯-人血清蛋白(MogV-HS-HAS)为包被抗原, 通过方阵法^[6-8]确定包被抗原的工作浓度和抗血清的稀释度, 通过间接竞争酶联免疫吸附法(ELISA)来绘制不同浓度 MogV 对抗血清光密度值的抑制曲线, 来探讨 MogV 特异性抗血清识别 MogV 的能力^[9], 为建立快速检测 MogV 的 ELISA 法提供实验基础, 有利于今后在制药工业方面的推广运用。

1 材料与方法

1.1 实验材料

基金项目: 科技部科技人员服务企业项目(2009GJE10040); 广西自然科学基金项目面上项目(2010GXNSFA013251); 广西教育厅面上项目(200911MS170)

作者简介: 李丽, 女, 硕士, 实验师 Tel: (0773)5895291 E-mail: lili770215@yahoo.com.cn *通信作者: 段小群, 男, 博士, 硕导, 教授 Tel: (0773)5895058 E-mail: robertduan@163.com

MogV (含量为 98%, HPLC 检测)由广西师范大学资源与环境学系提供; MogV-HS-BSA(结合比约为 44:1)、MogV-HS-HSA(结合比约为 64:1)(自制)、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)、2, 2'-氨基-双(3-乙基-苯并噻唑啉-6-磺酸)铵盐(ABTS)显色剂均为 Sigma 公司产品; 辣根过氧化物酶标记的羊抗鼠 IgG 体(北京博爱森生物技术有限公司产品); 5~6 周龄 SPF 级 BALB/c 小鼠, ♀, 体质量 14~16 g, 实验动物合格证号: SCXK-桂-2009-0002, 由桂林医学院动物中心提供。其他试剂均为国产分析纯。

1.2 仪器

酶标仪(Bio-Tek); 磁力搅拌器(江苏恒丰仪器厂); 微量移液器(Eppendorf); 酶标板(JET BIOFIL, FEP-100-096)等。

1.3 MogV 特异性抗血清的制备

将 MogV-HS-BSA 溶于 Tris-HCl 溶液(pH8.0), 配成 $20 \text{ mg}\cdot\text{mL}^{-1}$, 以磷酸盐缓冲液(PBS)稀释到 $200 \text{ }\mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$ 。取 0.5 mL 上述稀释溶液, 加入 0.5 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。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, 直接注射 $200 \text{ }\mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$ MogV-HS-BSA 的 PBS 稀释液 0.5 mL。第 3 次加强免疫 4 d 后摘取眼球采血, 将所采得的血液置于硅烷化 Eppendorf 离心管中, 于 $10\,000 \text{ r}\cdot\text{min}^{-1}$ 离心 5 min, 分离血清, 得 MogV 特异性抗血清。 $-80\text{ }^{\circ}\text{C}$ 保存。

1.4 间接竞争 ELISA 法的建立

1.4.1 交叉反应性实验 将 BSA、HSA 分别以用碳酸缓冲液稀释为 $1 \text{ }\mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$ 包被酶标板, 阴性对照孔用 PBST 溶液包被, 每孔加 100 μL , $4\text{ }^{\circ}\text{C}$ 过夜, 用 5%脱脂牛奶封闭液封闭, 阳性血清作 1:1 000、1:2 000、1:4 000、1:5 000、1:16 000、1:32 000、1:64 000、1:128 000 稀释后顺序加入, 用新鲜配制的 ABTS 底物显色剂显色, 标仪测定 OD(405 nm)值。

1.4.2 最佳包被抗原复合物浓度和抗体工作浓度的确定 采用方阵滴定法, 将 MogV-HS-HSA 复合物用碳酸缓冲液稀释为 3.0, 2.5, 2.0, 1.5, 1.0, 0.50, 0.25 $\mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$, 每孔加 100 μL , $4\text{ }^{\circ}\text{C}$ 过夜, 用 5%脱脂牛奶封闭 3 h, 将阳性血清作 1:500、

1:1 000、1:2 000、1:4 000、1:5 000、1:16 000、1:32 000 稀释后依序加入, 将未免疫 BALB/c 小鼠血清按上法依次稀释做阴性对照, 将 PBST 溶液(Tween-20 含量为 0.05% PBS 溶液)为空白对照, 加新鲜配制的 ABTS 底物显色剂显色, 用酶标仪测定 OD(405 nm)值。

竞争性抑制曲线的建立 将 MogV-HS-HSA 复合物用碳酸缓冲液稀释为 $1 \text{ }\mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$, 每孔加 100 μL , $4\text{ }^{\circ}\text{C}$ 过夜, 洗涤 3 次, 每次 3 min。每孔加 5%脱脂牛奶封闭液 300 μL , $37\text{ }^{\circ}\text{C}$ 温箱 1 h, 洗涤同上。将 MogV 与血清 1:1 混合, MogV 稀释为 10, 1, 1×10^{-1} , 1×10^{-2} , 1×10^{-3} , 1×10^{-4} , 1×10^{-5} , $1\times 10^{-6} \text{ }\mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$; 阳性血清稀释为 1:8 000 后顺序加入, 每孔 100 μL , 每块板同时设空白对照, 阴性对照按“1.4.2”项下方法配制, 用新鲜配制的 ABTS 底物显色剂显色, 测定 OD(405 nm)值。

2 结果

2.1 交叉反应性实验结果

BSA、HAS 交叉反应性实验结果见表 1。BSA 的 OD(405 nm)值比较大, HAS 的 OD(405 nm)值比较小接近阴性对照孔说明抗血清中有抗 BSA 的特异性抗体生成, 而无抗 HAS 特异性抗体生成, 抗血清与 BSA 和 HAS 之间无交叉反应性。

表 1 BSA 与 HAS 交叉反应性实验结果

Tab 1 The experimental results of BSA and HAS cross reactivity

血清稀释度	OD(405 nm)值		
	BSA	HAS	PBST
1:1 000	1.922	0.295	0.135
1:2 000	1.526	0.239	0.135
1:4 000	1.220	0.213	0.128
1:8 000	1.074	0.168	0.126
1:16 000	0.705	0.153	0.130
1:32 000	0.559	0.146	0.125
1:64 000	0.361	0.144	0.128
1:128 000	0.254	0.157	0.127

注: BSA、HAS 的包被浓度均为 $1 \text{ }\mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$

Note: The package concentration of BSA, HAS was $1 \text{ }\mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$

2.2 最佳包被抗原复合物浓度和抗血清工作浓度

方阵滴定实验结果见表 2。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。由结果可知, 包被抗原的最佳包被浓度为 $1 \text{ }\mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$, 抗血清的最佳稀释度为 1:8 000。

表 2 方阵滴定实验结果

Tab 2 The results of titration experiment

抗原浓度/ $\mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$	OD(405 nm)值							
	1	2	3	4	5	6	7	8
3.0	2.235	2.115	1.925	1.681	1.376	1.159	0.720	0.135
2.5	2.189	2.044	1.958	1.823	1.413	1.008	0.647	0.135
2.0	2.143	2.055	1.799	1.674	1.351	0.914	0.564	0.128
1.5	2.066	1.923	1.724	1.613	1.321	0.876	0.557	0.126
1.0	2.018	1.982	1.728	1.539	1.256	0.804	0.489	0.130
0.50	1.857	1.812	1.489	1.219	0.803	0.538	0.313	0.128
0.25	1.819	1.700	1.109	0.743	0.548	0.365	0.244	0.127

注：1~7-MogV 特异性抗血清稀释度依次为 1：500，1：1 000，1：2 000，1：4 000，1：8 000，1：16 000，1：32 000；8 为阴性对照

Note: 1-7-MogV specific antiserum dilution in order were 1：500，1：1 000，1：2 000，1：4 000，1：8 000，1：16 000，1：32 000，the 8 was negative control

2.3 竞争性抑制曲线

竞争性抑制曲线见图 1。OD(405 nm)值随着 MogV 浓度的增加而减少，在 $1\times 10^{-4}\sim 1\ \mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$ 呈线性的趋势，经 SPSS 软件分析得回归曲线 $Y=-0.158X+0.298$ ， $r=0.991\ 0$ ，说明 MogV 浓度在 $1\times 10^{-4}\sim 1\ \mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$ 范围内，对抗血清 OD(405 nm)值的抑制呈良好线性关系。

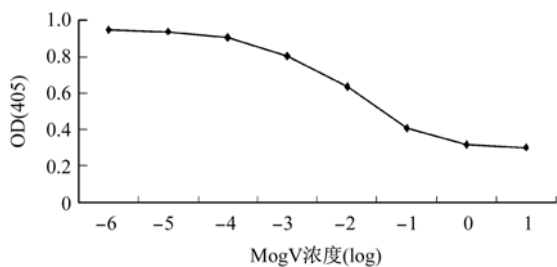


图 1 MogV 竞争性抑制血清抗体与包被抗原结合的 OD(405 nm)值

Fig 1 The OD(405 nm) value of the MogV competitive inhibitory serum antibody combine with the coated antigen

3 讨论

本方法诱导产生的血清抗体具有抗 BSA 的结合位点，而没有产生抗 HAS 的结合位点，血清抗体在这两种蛋白之间无交叉反应性，说明本实验以结合比约为 44：1 的 MogV-HS-BSA 为免疫抗原制备抗血清，以结合比约为 64：1 的 MogV-HS-HSA 为包被抗原检测抗血清的方法可行。经方阵滴定实验得出包被抗原的最佳包被浓度为 $1\ \mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$ ，抗血清的最佳稀释度为 1：8 000，以此为工作浓度绘制竞争性抑制曲线 OD(405 nm)值随着 MogV

浓度的增加而减少，并在一定范围内有呈线性的趋势，说明血清中的抗体对 MogV 有特异性识别，这为建立 ELISA 法大批量的快速检测 MogV 提供了实验基础，有利于今后在制药工业方面的推广运用。

REFERENCES

- [1] Ch.P(2005)Vol I (中国药典 2005 年版. 一部) [S]. 2005: 147.
- [2] ZHOU Y, YU B, HUANG C F. Multi-functional study of extract isolated from leaf and vine of Lo Han Kuo (*Siraitia grosvenori* Swingle) in large-scale extraction [J] Chin J Mod Appl Pharm(中国现代应用药学), 2010, 27(1): 23-27
- [3] TAKEMOTO T, ARIHARA S, NAKAJIMA T, et al. Studies on the constituents of Fructus Momordicae. I. On the sweet principle [J]. Yakugaku Zasshi, 1983, 103(11): 1151-1154.
- [4] LIANG C Q, SU X J, ZHANG J. China's present situation of reserch on Fructus Momordicae and its developing trend announced by documental statistics and analysis [J]. Guangxi Trop Agric(广西热带农业), 2005(2): 15-18.
- [5] LI L, LI Y W, DUAN X Q, et al. Detection and evaluation of the immunogenicity of Mogrosides V artificial antigen [J]. Immunol J(免疫学杂志), 2011, 27(10): 850-852.
- [6] ZHAO S J, HOU C X, QIAN Y C, et al. Preparation and identification of monoclonal antibody against ginsenoside Rb1 [J]. J Jilin Univ(吉林大学学报), 2007, 37(1): 245-248.
- [7] 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.
- [8] SUN J, HU S, SONG X. Adjuvant effects of protopanaxadiol and protopanaxatriol saponinsfrom ginseng roots on the immune responses to ovalbumin in mice [J]. Vaccine, 2007, 25(6): 1114-1120.
- [9] XU J, TANAKA H, SHOYAMA Y. One-step immunochromatographic separation and ELISA quantification of glycyrrhizin from traditional Chinese medicines [J]. J Chromatogr B Analyt Technol Biomed Life Sci, 2007, 850(1/2): 53-58.

收稿日期：2011-11-10