

中药活性小分子人工抗原合成的技术要点

屈会化^{1,3}, 赵 琰^{1,2*}, 李翼飞^{1,2}, 杨爱玲^{1,2}, 王庆国^{1,2*}

1. 北京中医药大学“经典方剂的应用基础研究”创新团队, 北京 100029

2. 北京中医药大学基础医学院, 北京 100029

3. 北京中医药大学 科研实验中心, 北京 100029

摘 要: 中药免疫分析技术适用于中药复杂组分的研究, 基于此技术的研究思路与方法越来越引起研究者的重视。免疫分析的前提是抗体制备, 中药活性小分子人工抗原的合成是中药活性成分抗体制备的关键步骤。从载体的选择、交联方法的选择、纯化及鉴定方法、合成条件的优化及影响免疫原性的因素等方面, 对中药活性小分子人工抗原合成的技术要点进行综述, 从而为中药免疫分析技术的建立和发展奠定基础。

关键词: 中药活性小分子; 人工抗原; 免疫分析法; 中药免疫分析; 载体

中图分类号: R285 **文献标志码:** A **文章编号:** 0253-2670(2012)10-1880-06

Key techniques in artificial antigen synthesis of active small molecule in Chinese materia medica

QU Hui-hua^{1,3}, ZHAO Yan^{1,2}, LI Yi-fei^{1,2}, YANG Ai-ling^{1,2}, WANG Qing-guo^{1,2}

1. “The Basic Research of Classic Recipe Application” Innovation Research Team, Beijing University of Chinese Medicine, Beijing 100029, China

2. School of Preclinical Medicine, Beijing University of Chinese Medicine, Beijing 100029, China

3. Center of Scientific Research, Beijing University of Chinese Medicine, Beijing 100029, China

Abstract: Immunoassay technology is suitable for the study on complex components in Chinese materia medica (CMM). Research ideas and methods based on this technology have drawn the increasing attention of researchers. The premise of the immunoassay is antibody preparation and the critical step of antibody preparation of active ingredients in CMM is the artificial antigen synthesis of active small molecule in CMM, of which the key technology is summarized in this article, including carrier choice, methods for cross-linking, purification and identification of artificial antigens, the optimization of the synthesis conditions as well as factors influencing the immunogenicity. This article is supposed to lay the foundation for the establishment and development of CMM immunoassay technology.

Key words: active small molecule in Chinese materia medica; artificial antigen; immunoassay method; immunoassay of Chinese materia medica; carrier

应用现代生物工程技术对中药活性成分进行深入研究, 是实现中医药现代化的重要途径^[1]。免疫分析技术以抗原与抗体的特异性、可逆性结合反应为基础, 具有常规理化分析技术无可比拟的选择性和高灵敏性(可检测到纳级甚至皮级水平)^[2], 非常适用于复杂物质中痕量组分的分析, 并具有简捷、准确、灵敏、检测容量大、成本低、适应性强等优势。

基于此原理的中药免疫分析法, 是研究中药复杂组分体内过程、作用机制和靶点、配伍机制、物质基础、质量控制等方面的新思路和新方法, 越来越引起研究者的重视^[3]。

免疫分析的前提是制备抗体。中药活性成分90%以上为小分子(相对分子质量<2 500), 如黄酮类、蒽醌类、皂苷类、有机酸等, 只具有反应原

收稿日期: 2012-06-07

基金项目: 国家自然科学基金资助项目(30973709, 81274043); 国家教育部回国人员科研启动基金

作者简介: 屈会化(1966—), 男, 副研究员, 硕士生导师, 研究方向为中药免疫分析技术。Tel: (010)64286705 E-mail: quhuihua@gmail.com

*通讯作者 赵 琰 Tel: (010)64286705 E-mail: zhaoyandr@gmail.com

王庆国 Tel: (010)64286727 E-mail: wangqg8558@sina.com

性而不具有免疫原性,需要与相对分子质量大的载体以共价键相耦联制备成人工抗原,才能免疫动物产生特异性抗体^[4]。因此中药活性小分子人工抗原的合成,是中药活性成分抗体制备的关键步骤。人工抗原合成是一个复杂的化学反应过程,需要从载体的选择、交联方法的选择、纯化及鉴定方法的选择等多个方面着手,本文对中药活性小分子人工抗原合成的技术要点进行综述,为中药免疫分析技术的建立和发展奠定基础。

1 载体的选择

载体应具备以下特点:(1)表面应具有化学活性基团,可以直接与小分子耦联,这是化学耦联制备抗原的前提;(2)具备一定的容量,可以耦联足够的分子;(3)应该是惰性的,不应干扰耦联分子的功能;(4)具有足够的稳定性,且应廉价易得。用作耦联载体的有蛋白质类、多肽聚合物、大分子聚合物和某些颗粒,载体的选择要考虑免疫原性、溶解性及来源、相对分子质量、价格、活性基团能否与小分子形成合适的耦联等因素。一般认为,用与免疫动物亲缘关系较远的蛋白作为载体有利于诱导较强的免疫应答^[5]。

1.1 牛血清蛋白

牛血清蛋白(bovine serum albumin, BSA)相对分子质量 6.8×10^4 ,由581个氨基酸残基组成,其中35个半胱氨酸组成17个二硫键,在肽链的第34位有1个自由巯基。其物理化学性质稳定、不易变性、经济易得,而且赖氨酸含量高,自由氨基多,与半抗原耦联率高,在不同的pH值和离子强度下均有较大的溶解度,在含有有机溶剂(如吡啶、*N,N*-二甲基甲酰胺)情况下也可和半抗原进行耦联,且在耦联后仍保持可溶状态,因此目前人工抗原的载体以BSA最为常用。在人参皂苷Rb₁、甘草酸、黄精皂苷等许多中药活性成分小分子人工抗原的合成过程中,都选择BSA作为载体^[6-14]。

1.2 鸡卵清蛋白

鸡卵清蛋白(ovalbumin, OVA)由386个氨基酸组成,相对分子质量约为 4.3×10^4 。在各种疫苗及生物药的生产制备中,OVA常作为蛋白添加剂以提高生物药或疫苗等的稳定性,或在抗体制备过程中作为载体蛋白用于半抗原的耦联,也常作为蛋白相对分子质量标准用于电泳或色谱。OVA价格较便宜,性质稳定,但溶解性稍差,在中药活性成分小分子人工抗原的合成过程中,OVA通常作为包被

抗原的载体,与小分子半抗原耦联,合成完全抗原用于包被酶标板^[6,8-14]。

1.3 钥孔血蓝蛋白

钥孔血蓝蛋白(keyhole limpet hemocyanin, KLH)是一种高相对分子质量海洋生物蛋白,在抗体和免疫血清制备中,可用作载体蛋白与半抗原耦联制备完全抗原。但是由于价格昂贵,虽然免疫原性强,但其激发的B淋巴细胞克隆中针对自身抗原决定簇多,相对减少了针对半抗原的B淋巴细胞克隆,增加阳性克隆筛选的难度和工作量。KLH在人工抗原合成领域的研究相对较少,国外学者使用血蓝蛋白作为载体合成了去氧麻黄碱、壬基酚等人工抗原^[15-16]。

1.4 人血清蛋白

人血清蛋白(human serum albumin, HSA)由585个氨基酸组成,相对分子质量为 6.9×10^4 ,含有常见的18种氨基酸,占人血清总量的51%~71%。单条多肽链由大约17个二硫键交叉连接,每个分子只含有1个游离巯基。研究报道了采用HSA作为载体分别合成了芍药苷(PF)和氯霉素(CAP)的人工抗原^[17-18]。

1.5 人工合成多聚赖氨酸

近年来有报道用人工合成的多聚肽(多聚L-赖氨酸, PLL)作为载体,与常用的蛋白质类载体相比,PLL链上的ε-氨基密度更大(与BSA相对分子质量相当的PLL自由氨基数约是BSA的10倍),耦联反应也更容易进行,可以大大提高载体蛋白质与半抗原的耦联率。此外PLL是直链分子,结构简单,自身免疫原性小,在获得的抗体中抗载体的部分较少,对半抗原的特异亲和性高,能增加半抗原的免疫原性^[19-20]。采用PLL作为人工抗原载体,一则避免了普通蛋白质过强的免疫原性,减弱了抗小分子抗体的产生,同时也避免了小分子与普通蛋白质上的氨基以外的基团发生反应。但针对PLL作为人工抗原载体的相关文献报道较少,如采用PLL作为载体制备了甲胺磷的人工抗原^[21]和黄芩苷的包被抗原^[22]。

2 交联方法的选择

小分子半抗原与载体蛋白耦联效果会受到耦联物的浓度及其相对比例、耦联剂的有效浓度及其相对量、缓冲液成分及其纯度和离子强度、pH值以及半抗原的稳定性、可溶性和理化特性等因素的影响。通常是在条件温和的水溶液中将半抗原与载体蛋白

共价结合,不宜在高温、低温、强碱、强酸条件下进行。

大多数中药小分子都具有直接与载体蛋白质交联的功能基团,如 $-NH_2$ 、 $-COOH$ 、 $-OH$ 、 $-SH$,可根据不同的活性基团选择不同的偶联剂和偶联方法将其与载体偶联。主要要求制备的人工抗原保持半抗原的结构特异性;所用交联方法不要明显改变半抗原结构,要保留抗原决定簇。必要时可在半抗原与载体之间引入一定碳链长度的桥结构,暴露抗原决定簇,以利于产生针对半抗原的抗体。目前在中药活性成分人工抗原合成中常用的交联方法有以下几种。

2.1 碳二亚胺法

碳二亚胺(EDC)使羟基和氨基间脱水形成酰胺键,半抗原上的羧基先与EDC反应生成一个中间体,然后再与蛋白质上的氨基反应,形成半抗原与蛋白质的结合物。EDC作为酰胺键的形成介质并没有形成手臂分子,因此被称作零长度交联剂。此连接方法十分简便,只需将载体蛋白质和抗原按一定比例混合在适当的溶液中,然后加入水溶性EDC,搅拌1~2 h,置室温24 h,再经透析即可。如果半抗原分子中不含羧基,可通过某些化学反应引入羧基后用此法进行偶联。

EDC法在含羧基的中药活性成分人工抗原的合成中应用最广泛,同时也能应用于含有脂肪胺的中药活性成分。如雷公藤内酯醇(TP)和不同的蛋白载体(阳离子化BSA、OVA)偶联合成TP的人工免疫抗原和检测抗原^[11]、薯蓣皂素与BSA偶联成免疫原^[13]均采用了EDC。

2.2 活泼酯法

活泼酯法是对EDC法的改进,对于含有羧基的半抗原或药物,为减少蛋白分子间的自身聚合,可以先将药物分子上的羧基转化为 N -羟基琥珀酰亚胺基(NHS)的活泼酯,然后再与抗体交联。含有羧基的半抗原或药物在二环己基碳二亚胺(DCC)的作用下,与NHS反应,生成活泼酯衍生物,后者与载体蛋白上的氨基反应,形成以酰胺键连接的耦合物,以硼氢化钠还原后即可得到稳定的以碳-氮单键连接的结合物,反应过程中无需分离中间产物。

由于该法避免了EDC对蛋白的直接作用,从而避免了蛋白分子间的交联。在多种中药活性成分人工抗原的制备中都应用了活泼酯法:将黄精皂苷通过3位羟基的改造,制成3-琥珀酰薯蓣皂苷,再通

过DCC将其与BSA和OVA偶联制成免疫原和包被原^[9];通过酯化反应合成半抗原鬼臼毒素半琥珀酰酯,再利用活泼酯法和混合酸酐法偶联成免疫和包被所需的人工抗原^[14]。

2.3 混合酸酐法

羧基可以在三级胺存在下与氯甲酸异丁酯反应,生成活泼中间体混合酸酐,然后与蛋白载体上的伯氨基反应,形成酰胺交联键,反应过程简单、无需制备和分离中间产物。罗利等^[12]采用混合酸酐法合成川楝素的半抗原;姜玲等^[10]采用混合酸酐法合成槲皮素卵清蛋白结合物作为包被抗原,将槲皮素与BSA结合制成人工抗原。

2.4 过碘酸钠氧化法

糖类或含糖基化合物分子中的邻二醇结构可被过碘酸钠氧化为醛基,然后与蛋白分子中的氨基形成Schiff氏碱。过碘酸钠氧化法需要2步反应:第1步生成醛基衍生物后,过量的过碘酸盐必须除去或消耗后,方可进行与蛋白交联的第2步反应。这种方法比较温和,可在常温和中性pH值条件下进行。采用过碘酸钠氧化法合成的中药活性小分子人工抗原有甘草酸人工抗原^[8]、芍药苷人工抗原^[17]和人参皂苷Rb₁人工抗原^[6]等。

多种交联方法虽然能够满足各方面的需要,但也增加了使用者选择的困难。评价某一交联方法时,应该考虑以下因素^[23]:①交联反应的效果,如交联产物组成的均一性;②交联反应的产率;③交联过程对产物生物活性的影响;④交联反应的可操作性;⑤交联产物纯化的难易;⑥交联反应结果的可重复性;⑦耦合物的使用目的。理想的交联方法应该保证结合物产率较高、结合物的组成均一、交换比合适、最大限度的保持生物活性、操作方便、纯化容易、在同样条件下重复性好。然而,目前还没有一种交联方法能够同时满足上述要求。因此,必须根据结合物的使用目的,权衡不同方法的优缺点来选择合适的交联方法;最好同时使用几种交联方法进行比较,择优而用。

3 人工抗原的纯化

蛋白质交联反应中的小分子,如未结合的小分子、交联剂以及反应副产物,可以通过凝胶柱色谱、透析或硫酸铵沉淀等方法与高分子结合物分离。为了获得相对分子质量均一的产物,也可以采用高效液相色谱、电泳及离子交换柱色谱进行分离纯化。凝胶色谱所需时间较短,但操作相对复杂,需要对

流出组分进行跟踪分析,以确定目标组分;而透析法虽然所需时间较长(通常2 d以上),但由于其具有简单方便、对仪器要求低、纯化较为彻底等优点,在人工抗原合成过程中使用较为普遍。

4 人工抗原的鉴定

中药活性小分子-载体蛋白耦合物是否耦联成功,决定着动物免疫后能否产生目标抗体。对于蛋白结合产物,首先须鉴定小分子是否与蛋白载体连接上,然后再测定其中各组分的量。中药活性小分子-载体蛋白耦合物的鉴定一直是免疫化学技术领域一项很重要的工作,常用方法有以下几种。

4.1 紫外分光光度法

该方法依据中药活性小分子和载体蛋白具有不同的吸收特征,耦联成功后,耦联物往往会保留中药活性小分子和载体各自光谱特征,与原载体蛋白质的紫外图谱有一定的差异,根据蛋白质特定吸收峰的吸光度值和各自的原子摩尔消光系数可计算出两者的耦联比。此法为鉴定人工抗原最常用的方法,人参皂苷 Rb₁ 单克隆抗体、抗黄精皂苷多克隆抗体的制备与鉴定研究中就使用紫外分光光度法(UV)法对所合成的人工抗原进行了鉴定^[6,9]。但有时中药活性小分子本身缺少发色基团,耦联也未能产生新的发色基团,此时耦联物则没有明显区别于载体的可见-紫外光谱特征,即使耦联成功,UV法也不能给出有效的判定信息^[24]。

4.2 基质辅助激光解吸飞行时间质谱

基质辅助激光解吸飞行时间质谱(MALDI-TOF-MS)是近年来发展起来的一种软电离新型有机质谱,具有灵敏度高、准确度高、分辨率高、图谱简明、质量范围广及速度快等特点,在操作上制样简便,可微量化、大规模、并行化和高度自动化处理待检生物样品,因此在测定生物大分子和合成高聚物应用方面有特殊优越性。甘草酸人工抗原、PF与HSA耦联完全抗原的合成鉴定中使用了MALDI-TOF-MS方法^[8,17]。

4.3 其他方法

在槲皮素、川楝素、鬼臼毒素等人工抗原的合成鉴定中,还用到了质谱、核磁共振、红外光谱等鉴定手段^[10,12]。还有学者使用一定量的标记半抗原,反应结束后测定透析前后的放射强度,从而计算半抗原的耦联比;也可以直接测定提取半抗原-蛋白质结合物的放射性,计算耦联比。另外,SDS聚丙烯酰胺凝胶电泳根据人工抗原和原载体蛋白质在条带

上的位置变化也可直接来判断抗原合成的情况,并根据蛋白质分子的相对迁移率计算耦联比^[14]。这些方法的单独或联合使用,为人工抗原的成功合成以及耦联比的测定提供了有效的手段。

5 人工抗原合成条件的优化

在中药人工抗原的合成过程中,酸碱度(pH)、温度、浓度等因素影响人工抗原耦联比,也与其免疫原性的强弱密切相关,所以各种反应条件及影响因素的考察与优化也是人工抗原合成的一个重要组成部分。对绿原酸(CGA)人工抗原合成及反应条件的优化研究结果显示,反应中pH值的变化会使蛋白质不稳定产生沉淀析出,NHS直接影响取代从而影响蛋白质和抗原的连接,分析认为NHS的量和pH值是影响耦联率的重要因素,影响因素作用的大小顺序是NHS与EDC的比值>反应的pH值>CGA与BSA的比值>EDC与CGA的比值,通过对CGA-BSA合成条件的优化使其半抗原与载体蛋白的结合比由2:1上升至14:1^[25]。

6 影响中药人工抗原免疫原性的因素

抗原合成后,单纯用化学方法鉴定小分子与载体蛋白质共价结合,并不能表明用此抗原免疫动物一定能产生合格的抗体。免疫原性优劣的影响因素不尽相同,一方面取决于人工抗原本身的性质,另一方面取决于接受该抗原刺激的机体的反应性。在水中溶解性较小的抗原,其免疫原性较大。特异性抗体能否形成,与动物的种类、年龄、性别、免疫程序有关,抗原的免疫原性还与半抗原与载体蛋白的耦联率和半抗原蛋白结合物的分子结构有关^[24]。

6.1 人工抗原分子特性

6.1.1 耦联比 每分子载体上结合的药物分子数,即载体蛋白的耦联比是影响人工抗原免疫效果的重要因素。一般认为药物结合量越大越好,但最佳耦联比也取决于半抗原的本质及载体的性质。由于抗体的特异性主要针对半抗原分子中远离耦联键的结构,因此,在设计人工抗原结合物时,应选择远离半抗原特征结构的基团进行交联。之前曾认为载体表面半抗原密度越大,越有利于提高人工抗原的免疫原性,但研究结果并非如此,这可能由于过多的半抗原影响了载体蛋白质与淋巴细胞表面的接触致使免疫反应减弱。不同中药人工抗原具有不同的最佳耦联比,一般来说当耦联比为3:1~45:1时免疫原性较强^[26],也有研究表明最佳耦联比为10:1~20:1^[27]。为了取得最佳免疫效果,不同的中药

活性小分子应逐个确定与各种载体的最佳耦联比。

6.1.2 耦联桥 抗原分子的特殊化学基团与淋巴细胞表面相应受体接触的难易程度也影响着抗原的免疫原性。一定长度耦联桥的介入,有助于半抗原暴露在外面,增强所产生抗体的专一性。由于免疫系统对中药半抗原-载体结合物中载体远端的半抗原识别性强,故耦联桥应选择在远离待测物结构的部分和官能团,且应具有一定的长度,以利于诱导高选择性和高亲和性的抗体。耦联桥的长度和结构对抗体的特异性、效价可造成较大的干扰,过短,载体的空间位阻影响免疫系统的识别;过长,则可能由于耦联桥间的氢键或水交互作用而发生半抗原的“重叠”而影响免疫原性。如果耦联桥的结构过于复杂,制备的抗体则可能对耦联桥的亲合力强而对待测物小分子的特异性弱。可以采取2种方法来减少耦联桥造成的不足:一是在半抗原的相同结合位点结合载体蛋白,但免疫原和包被原应使用不同的耦联桥;二是使用相同的耦联桥而选择不同的结合位点。研究表明耦联桥为3~6个碳原子直链结构最有利于保护抗原决定簇、提高抗体特异性^[28]。

6.1.3 半抗原的分子空间结构 分子结构和空间结构越复杂、支链越多,免疫原性越强,越易于诱导机体产生抗体;分子中环状结构较多,免疫原性也必定较强^[5]。对于具有多个载体耦联位点的中药半抗原,以不同位点相耦联制备的抗原,其相应的特异性、亲和性、效价也都不相同,即以不同耦联位点制备的抗原的空间结构不同所致。因此,当一个中药分子内部有多个不同的结合位点时,要尽可能多合成不同的人工抗原,然后通过比较筛选出最好的抗原用于抗体制备。可以适当改变半抗原结合部位的结构或引入交联活性基团,使制备人工抗原的方法更加多样化。

6.2 宿主生物系统

不同种类或同种不同个体动物对同一种免疫原的应答有很大差别,这与受体动物个体基因不同和动物本身的发育和生理状况不同有关。有些抗原对一种动物有免疫原性而对另一种动物却无免疫原性,故选择受体动物时既要考虑适宜的品种,又要考虑所选动物的健康状况、生理状态。通常首选年轻和雌性动物^[29]。

6.3 免疫方法的影响

免疫原的剂量、接种途径、次数及免疫佐剂的种类,都明显影响机体对抗原的应答。免疫剂量过

大会引起免疫耐受或动物死亡;过少则不能引起免疫应答。一般颗粒性抗原用量要少,可溶性蛋白和多糖抗原用量要适当增大。免疫途径以皮内效果最好,次之为皮下,肌肉、腹腔、静脉的效果稍差,口服易诱导免疫耐受。免疫佐剂选择时要考虑到弗氏佐剂主要诱导IgG类抗体产生,明矾佐剂易诱导IgE类抗体产生。免疫方案应视不同动物和免疫原的种类分别制定^[29]。

7 展望

不同的中药活性成分合成人工抗原,其质量影响因素不完全相同,需要在得到相应的抗体后,根据抗体的特异性、亲和性的优劣,再对人工抗原的具体合成方案进行调整。另外,中药活性成分结构复杂、类型多样,而且某些中药活性成分,往往存在多个结构类似的化合物,其中一个成分的抗体,可能与其他成分产生交叉反应,特别是异构体化合物,如绿原酸具有多个异构体,它们之间的交叉反应强烈。因此,相对于单一成分的化学药物,中药化学成分单克隆抗体在人工抗原的合成方法、克隆筛选方法等方面有较高的要求,应加强不同化学结构类型中药活性小分子人工抗原合成方法的研究。

参考文献

- [1] 朱学泰,马瑞君,谢 溱. 单克隆抗体在中草药研究中的应用前景 [J]. 中草药, 2005, 36(6): 945-947.
- [2] 李丽华,刘文泰. 抗中药成分特异性抗体在中药质量检测中的应用探讨 [J]. 中国中医基础医学杂志, 2008, 14(9): 686.
- [3] 屈会化,赵 琰,王庆国. 利用免疫芯片技术筛查中药注射剂致敏成分 [J]. 北京中医药大学学报, 2008, 31(1): 23-25.
- [4] Mercader J V, Pantaleon C S, Agullo C, *et al.* Hapten synthesis and monoclonal antibody-based immunoassay development for detection of the fungicide trifloxystrobin [J]. *J Agric Food Chem*, 2008, 56(8): 2581-2588.
- [5] 李俊锁,邱月明,王 超,等. 兽药残留分析 [M]. 上海: 上海科学技术出版社, 2002.
- [6] 赵寿经,侯春喜,钱延春. 人参皂苷 Rb1 单克隆抗体的制备与鉴定 [J]. 吉林大学学报: 工学版, 2007, 37(1): 245-248.
- [7] Nah J J, Song J Y, Choi S, *et al.* Preparation of monoclonal antibody against ginsenoside Rf and its enzyme immunoassay [J]. *Biol Pharm Bull*, 2000, 23(5): 523-526.
- [8] 蔡碧双,邵幼岩,林纪昀,等. 甘草酸人工抗原的合成鉴定及免疫原性分析 [J]. 中国生化药物杂志, 2008,

- 29(1): 19-22.
- [9] 齐 斌, 谷文英. 抗黄精皂苷多克隆抗体的制备 [J]. 食品与生物技术学报, 2006, 25(2): 17-23.
- [10] 姜 玲, 章文才, 柯 云. 抗槲皮素抗体的研制 [J]. 免疫学杂志, 2000, 16(5): 383-386.
- [11] 唐 波, 刘 晓, 徐晓昱. 雷公藤内酯醇人工抗原的合成及多克隆抗体的制备 [J]. 东南大学学报, 2008, 27(6): 409-414.
- [12] 罗 利, 张 静, 刘 媛, 等. 川楝素半抗原设计及其抗体制备 [J]. 中国农业科学, 2008, 41(8): 2332-2338.
- [13] 胡江丽, 李家儒, 何 骥. 薯蓣皂素免疫原的合成及其免疫效果分析 [J]. 武汉大学学报: 理学版, 2003, 49(6): 783-786.
- [14] 徐敦明, 余向阳, 刘映前, 等. 鬼臼毒素人工抗原的合成与鉴定 [J]. 药学学报, 2005, 40(6): 518-524.
- [15] Kelly A, Byrnes-Blake A, Carroll B F I, *et al.* Generation of anti-(+) methamphetamine antibodies is not impeded by (+) methamphetamine administration during active-immunization of rats [J]. *Int Immunopharmacol*, 2001: 329-338.
- [16] Mart A A, Zherdev A V, Eremin S A, *et al.* Preparation of antibodies and development of enzyme-linked immunosorbent assay for nonylphenol [J]. *Environ Anal Chem*, 2004, 84(13): 965.
- [17] 徐金森. MALDI-TOF-MS 法测定芍药苷-人血清白蛋白复合物的半抗原数 [J]. 厦门大学学报: 自然科学版, 2006, 45(增刊): 54-56.
- [18] 滑 静, 徐修远, 于同泉, 等. 氯霉素人工抗原的合成及多克隆抗体的制备 [J]. 药物检测, 2004, 21(4): 30-31.
- [19] James P T, Fidel Z. Multiple antigen peptide [J]. *Immuno-methods*, 1989, 124: 53-56.
- [20] Jamps P T. Recent advances in multiple antigen peptides [J]. *Immunomethods*, 1996, 196: 17-32.
- [21] 赵肃清, 孙远明, 张春艳. 用多聚赖氨酸作载体制备抗甲胺磷抗体的研究 [J]. 中国免疫学杂志, 2002, 18: 380.
- [22] 屈会化, 赵 琰, 王雪茜, 等. 黄芩苷人工抗原的合成与鉴定 [J]. 北京中医药大学学报, 2010(9): 606-609.
- [23] 洪孝庄, 孙曼霁. 蛋白质连接技术 [M]. 北京: 中国医药科技出版社, 1993.
- [24] 刘燕婷, 钟青萍, 雷红涛, 等. 基于不同载体免疫原制备河豚毒素抗体的研究 [J]. 卫生研究, 2008, 37(3): 234-236.
- [25] 林 辉, 刘 屏, 王建勋, 等. 绿原酸人工抗原的合成及反应条件的优化 [J]. 中国中药杂志, 2009, 34(15): 1906-1909.
- [26] 谢 晶, 叶健强, 余 华, 等. 动物性食品中兽药人工抗原合成的研究 [J]. 畜牧兽医杂志, 2011, 30(1): 28-30.
- [27] Schneider P, Hammock B D. Influence of the ELISA for s-triazine herbicides using monoclonal antibodies [J]. *J Agric Food Chem*, 1992, 40: 525.
- [28] Freia J. Detection of pesticides residues by enzyme immunoassay [J]. *Pest Sci*, 1989, 26: 303-307.
- [29] Howard G C, Kaser M R. 抗体制备与使用实验指南 [M]. 北京: 科学出版社, 2010.