

中药小分子单克隆抗体制备技术研究进展

章 飏^{1,2}, 李彦川², 高 雯¹, 李细芬², 张兰兰^{2*}, 李 萍^{1*}

1. 中国药科大学 天然药物活性组分与药效国家重点实验室, 江苏 南京 210009

2. 数字本草中医药检测有限公司, 河北 保定 071200

摘 要: 近年来免疫分析技术在中医药领域广泛应用, 尤其是在中药质量控制、中药安全性评价、中药(复方)机制研究等方面发挥了重要作用, 其中中药小分子单克隆抗体的制备是这些应用的前提和关键。主要从完全抗原制备、动物免疫、杂交瘤细胞株建立及单克隆抗体生产等方面进行综述, 特别对近 20 年已报道且具有代表性的中药小分子抗原抗体品种进行梳理, 为中药小分子单克隆抗体的研究及应用提供参考。

关键词: 中药小分子; 单克隆抗体; 完全抗原制备; 动物免疫; 抗原抗体品种

中图分类号: R285 **文献标志码:** A **文章编号:** 0253-2670(2018)10-2469-08

DOI: 10.7501/j.issn.0253-2670.2018.10.032

Research progress on preparation of small molecular monoclonal antibodies in Chinese materia medica

ZHANG Biao^{1,2}, LI Yan-chuan², GAO Wen¹, LI Xi-fen², ZHANG Lan-lan², LI Ping¹

1. State Key Laboratory of Natural Medicines, China Pharmaceutical University, Nanjing 210009, China

2. Digital Materia Medica Traditional Chinese Medicine Testing Co., Ltd., Baoding 071200, China

Abstract: In recent years, immunoassay has been widely used in traditional Chinese medicine. It plays an important role in the quality control, the safety evaluation, and the mechanism research of Chinese medicine or compound medicine. Among them, the premise and key of the application is the preparation of monoclonal antibodies of small moleculars. This review summarized preparation of complete antigen, animal immunization, establishment of hybridoma cell lines, and production of monoclonal antibody. Especially, the varieties of representative antigen and antibody reported in recent 20 years were combed, which will provide the reference for the research and application of small molecular monoclonal antibodies of Chinese materia medica.

Key words: small molecular in Chinese materia medica; monoclonal antibody; complete antigen preparation; animal immunization; variety of antigen and antibody

单克隆抗体是由一种识别特定抗原决定簇的杂交瘤细胞株分泌, 具有特异性强、灵敏度高、来源稳定、性能优良的特点^[1], 是免疫分析技术的前提和关键。中药小分子单克隆抗体的制备过程可分为合成并鉴定完全抗原、免疫动物、细胞融合、筛选并克隆化阳性杂交瘤细胞株、单克隆抗体的大规模生产及纯化。

大多数中药的活性成分包括黄酮类、醌类、苷类、生物碱类等, 是小分子类半抗原(相对分子质量 < 2 500), 只具有反应原性而不具有免疫原性,

需要与载体蛋白偶联制备完全抗原, 才能免疫动物得到抗体^[2]。

国内外科研人员在中药小分子抗体这一领域做了大量的研究和探索, 并应用于中医药的现代化研究中, 本文主要对中药小分子单克隆抗体制备技术研究进展进行综述。

1 完全抗原制备

中药小分子单克隆抗体制备的过程与常规的单克隆抗体制备无较大差异, 前者的重点在于以合适的方式制备完全抗原。在制备时, 小分子通过偶联

收稿日期: 2017-11-19

基金项目: 天津市科技计划项目(17YFCZZC00350)

作者简介: 章 飏(1994—), 男, 硕士研究生, 研究方向为中药质量控制。E-mail: zhangbiao36@qq.com

*通信作者 李 萍, 女, 教授。E-mail: liping2004@126.com

张兰兰, 女, 副研究员。E-mail: zhangll2@tasly.com

剂与载体偶联,偶联剂的结构可阻止小分子在偶联结合时被包埋在卷曲凹陷的载体蛋白中,从而更易被 B 细胞识别^[3]。

1.1 载体蛋白

合适的载体蛋白是成功制备完全抗原的要素之一,常见的有牛血清白蛋白(BSA)、鸡卵清白蛋白(OVA)、钥孔嘁血蓝蛋白(KLH)、人血清白蛋白(HSA)、兔血清白蛋白(RSA)等。

其中,BSA 因其理化性质稳定、自由氨基多且价廉易得,在不同的 pH 和离子强度下以及在含某些有机溶剂的情况下仍保持较大的溶解度^[4],常作为合成完全抗原的载体。OVA 常作为合成包被抗原的载体,包被原用于包被酶标板^[5]。KLH 因其激发

针对自身的免疫多于针对小分子的,且价格昂贵,应用较少。苏歆^[6]根据黄芩苷的分子结构特征和理化特性,以 BSA 为载体,探究了不同实验条件下对黄芩苷完全抗原合成的影响。成金俊^[7]以 BSA、OVA 作为载体,制备淫羊藿苷的完全抗原和包被原,并分别免疫动物及测定效价等。

1.2 偶联方式

大多数中药小分子都具有如-COOH、-OH、-NH₂等活性基团,根据不同的基团采取不同的偶联方式。在制备完全抗原时,须保持小分子结构的特异性,如有必要可在小分子与载体蛋白之间引入一定长度的碳链,可利于产生针对小分子的抗体。常见的偶联方式^[4,8]有 5 类 11 种,具体见表 1。

表 1 常见偶联方式
Table 1 Common methods for coupling

基团	偶联方式	具体过程
羧基	碳二亚胺法	将小分子与碳二亚胺反应,羧基脱水后形成中间产物,再与载体蛋白的氨基偶联形成酰胺键;因碳二亚胺较活泼,亦可偶联醇类、胺、磷酸、氨基、巯基等活性基团
	活泼酯法	羧基在二环己基碳二亚胺的作用下,与 N-羟基琥珀酰亚胺反应,生成活泼酯衍生物,再与载体蛋白的氨基偶联形成酰胺键
	混合酸酐法	羧基与氯甲酸异丁酯反应,生成活泼的混合酸酐,再与载体蛋白的氨基偶联形成酰胺键
羟基	高碘酸钠法	将邻二醇氧化为醛基,再与载体蛋白的氨基偶联形成 Schiff 氏碱,以硼氢化钠还原 Schiff 氏碱可以形成稳定的单键
	琥珀酸酐法	将羟基在无水吡啶存在下转化为羧基,然后用羧基的方式偶联
	氯乙酸钠法	将羟基在碳酸钠存在下转化为羧基,然后用羧基的方式偶联
氨基	戊二醛法	载体和小分子的伯氨基分别与戊二醛两端的醛基与偶联,形成 Schiff 氏碱,但易形成相同蛋白间的连接,产物的均一性较差
	重氮化法	含芳香族伯胺的小分子与亚硝酸盐反应生成芳胺重氮盐,再与载体蛋白偶联形成偶氮键,副反应较多
巯基	Ellman 试剂法	Ellman 试剂即 5,5'-二硫-2,2'-双硝基苯甲酸,该试剂与巯基反应,可偶联带有巯基的蛋白
酮基	对-肼基苯甲酸法	将酮基在对-肼基苯甲酸存在下转化为羧基,然后用羧基的方式偶联
	Mannich 反应法	将酮基在甲醛和二级胺存在下转化为羧基,然后用羧基的方式偶联

1.3 完全抗原鉴定

完全抗原纯化后须经鉴定,以判断小分子与载体蛋白是否偶联成功,并计算其偶联比。偶联比是指偶联物的每分子载体蛋白偶联的小分子数。虽然偶联比对免疫效果有重要影响,但为充分非必要条件。常用的鉴定方法有动物免疫法、电泳法、薄层色谱法、红外光谱法、紫外扫描法、核磁共振法、质谱法等^[9],具体见表 2。

秦高凤等^[10]运用薄层色谱法和紫外扫描法鉴定

重楼皂苷 III 完全抗原,结果均显示偶联成功。屈保平^[11]在鉴定柴胡皂苷 c 的完全抗原时,采用了紫外扫描法和基质辅助激光解吸/电离质谱(MALDI-TOF-MS)法,偶联比为 17,发现 MALDI-TOF-MS 法较紫外扫描法具有较大的优势。

2 动物免疫

动物免疫一般采用的方法是先将完全抗原与佐剂混合成乳液,sc 6~8 周的雌性 BALB/c 小鼠,进行首次免疫。每 14 天进行 1 次加强免疫,并监测血

表 2 常用鉴定方法
Table 2 Common methods for identification

方法	操作	偶联比 (N)
动物免疫法	将完全抗原直接免疫动物, 使之产生抗体, 然后用 ELISA 法测定其效价, 从而达到鉴定的目的	—
电泳法	选择浓缩胶为 5%, 分离胶为 12.5%。取小分子, 载体蛋白和偶联物, 用超纯水稀释。将上述样品与 5 倍浓度的样品缓冲液混合, 使样品的终质量浓度为 100、200 μg/mL; 经 SDS-PAGE 电泳, 后用考马斯亮蓝染色, 在凝胶成像系统中拍照保存并分析。根据条带位置变化可判断是否偶联成功	$N=(Mc-Mb)/Ma$
薄层色谱法	取小分子, 载体蛋白和偶联物点于同一薄层板上, 以适宜小分子展开条件展开并显色。观察三者的比移值和显色来鉴别偶联物是否偶联成功; 常用来作为辅助鉴定	—
红外光谱法	取小分子、载体蛋白、偶联物及小分子与载体蛋白的物理混合物分别与 KBr 压片后, 进行红外扫描, 扫描范围 600~4 000 cm^{-1} , 分辨率 40 cm^{-1} , 扫描信号累加; 根据各物质的特征吸收峰, 可判断是否偶联成功	—
紫外扫描法	用磷酸盐缓冲液将小分子、载体蛋白、偶联物分别配成 25 μg/mL、1 mg/mL 和适宜浓度的溶液; 在紫外区 200~400 nm 进行扫描, 因小分子和载体蛋白具有不同的吸收特征, 偶联物会保留小分子和载体蛋白各自的光谱特征, 并计算偶联比, 可判断是否偶联成功	$N=(A_{ca} \times A_b - A_{ba} \times A_{cb}) \times C_a \times Mb / [(A_{ca} \times A_a - A_{ab} \times A_{ca}) \times C_b \times Ma]$
核磁共振法	取小分子、载体蛋白、偶联物及小分子与载体蛋白的物理混合物用 D_2O 溶解, 进行核磁共振; 通过特征峰的数目及强度比, 可判断是否偶联成功	—
MALDL-TOF-MS	用纯水将载体蛋白溶解, 用尿素将偶联物溶解, 并配制基质辅助溶液; 此质谱法能耐受较高浓度的缓冲液、部分非挥发性成分和去垢剂, 具有灵敏度高、检测范围宽、操作简便等特点	$N=(Mc-Mb)/Ma$

A_{ca} 、 A_b 、 A_{ba} 、 A_{cb} 、 A_a 、 A_{ab} 分别为偶联物在小分子、载体蛋白, 载体蛋白在小分子, 偶联物在载体蛋白、小分子, 小分子在载体蛋白的各最大吸收波长处的吸光度; C_a 、 C_b 分别为小分子、载体蛋白的浓度; Ma 、 Mb 、 Mc 分别为小分子、载体蛋白、偶联物的相对分子质量
 A_{ca} , A_b , A_{ba} , A_{cb} , A_a , and A_{ab} are the absorbance values at maximum absorption wavelength of conjugates in small molecular, carrier protein, carrier protein in small molecular, conjugates in carrier protein, small molecular and small molecular in carrier protein respectively; C_a and C_b are the concentration of small molecular and carrier protein respectively; Ma , Mb , and Mc are the relative molecular weight of small molecular and carrier protein, conjugates respectively

清效价, 若效价达到要求, 则可进行冲击免疫。动物免疫过程中佐剂的使用、免疫方案等, 对机体的免疫应答都有着重要的影响。

2.1 佐剂的使用

佐剂作为抗原的承载物, 可延缓抗原的清除, 延长抗原在体内刺激免疫系统的时间, 从而使抗体的产量增加。常见的佐剂分为 4 类^[12]: 无机佐剂、有机佐剂、油剂、合成佐剂, 如铝盐佐剂、弗氏佐剂、免疫刺激复合物、脂质体和类病毒颗粒等。以下介绍 2 种佐剂, 一种是目前认识和使用最广泛的

弗氏佐剂, 另一种是新型水溶性快速免疫佐剂 Quick Antibody。

2.1.1 弗氏佐剂 弗氏佐剂分为弗氏完全佐剂 (Freund's complete adjuvant, FCA) 和弗氏不完全佐剂 (Freund's incomplete adjuvant, FIA)。FIA 是油剂与乳化剂的混合物, 在其中加入灭活的分枝杆菌, 即为 FCA。

乳化前, 预热弗氏佐剂至 37 $^{\circ}\text{C}$, 并摇匀, 使油剂、乳剂或结核分枝杆菌在佐剂中均匀分布。乳化时, 取 50~100 μL 的 1 mg/mL 抗原溶液与等量的佐剂混

合乳化,因乳化后的免疫剂较黏稠,在转移或注射时会有损失,实际乳化量应适度多于理论使用量。乳化后,取 1 滴乳剂到盛有水的烧杯内,小乳滴在水面形成稳定的油珠,数分钟不扩散则说明乳化完成。

2.1.2 快速佐剂 目前有一种新型水溶性快速免疫佐剂 Quick Antibody,其作用机制为病原体相关分子模式^[13],主要是 Toll 样受体配体和阳离子聚合物以激发胞质受体来识别病原体。其优点是无毒、无需乳化、不破坏抗原的空间结构、使用前混匀后 im 即可。

Liu 等^[14]通过比较快速佐剂与弗氏佐剂发现,在相同的免疫剂量(50 μg/只)和免疫周期(35 d)内,快速佐剂可促进机体免疫系统产生抗体,虽抗血清效价低于相同条件下弗氏佐剂产生的应答效

应,但效价仍达上万以上,满足应用需求。免疫后快速佐剂处理组的小鼠大腿肌肉部位未发现有炎症、脓肿或肉芽肿出现,而弗氏佐剂处理组的小鼠 sc 部位发现有明显的肉芽肿。孙凤霞^[15]在相同免疫剂量下,快速佐剂的血清效价检测结果与弗氏佐剂相似,且抑制水平低于弗氏佐剂免疫小鼠。

2.2 免疫方案

不同实验室的免疫方案大同小异,都能得到有效的抗体或杂交瘤细胞株,典型的免疫方案见表 3。加强免疫的目的是进一步增加抗原反应的 B 细胞数量,提高血清抗体效价,而且抗体的类别会从以免疫球蛋白 M(IgM)为主转变为以免疫球蛋白 G(IgG)为主。

表 3 典型的免疫方案

Table 3 Typical immunization strategy

时间/d	操作	免疫剂类型	免疫途径
0	首次免疫	FCA+抗原	皮下多点注射
14	第 1 次加强免疫	FIA+抗原	皮下多点注射
28	第 2 次加强免疫	FIA+抗原	皮下多点注射
42	第 3 次加强免疫	FIA+抗原	皮下多点注射
56	第 4 次加强免疫	FIA+抗原	皮下多点注射
70	冲击免疫	抗原	腹腔注射

在免疫过程中,一般采用酶联免疫法测定效价,并以最大稀释倍数表示。徐金森^[16]在每次加强免疫后的第 7 天进行眼眶取血,屈会化等^[17]在第 3 次或第 4 次加强免疫后的第 7 天进行尾尖取血。根据血清抗体效价的高低,决定进行后续加强免疫或准备细胞融合工作。

3 杂交瘤细胞株建立与单克隆抗体生产^[18]

建立杂交瘤细胞株常用的方法是在冲击免疫后的第 3 天进行细胞融合。取骨髓瘤细胞与血清效价在 1:10 000 以上的小鼠脾细胞在聚乙二醇的诱导下 5~10:1 进行融合。融合后的细胞须进行筛选,得到的阳性细胞进行克隆化培养,从而得到既能遗传稳定又能分泌单一抗体的杂交瘤细胞株。

目前多数研究以动物体内诱生法来制备大量、高效价的单克隆抗体,再进一步分离和纯化抗体,并鉴定其特异性、类别及亚类、亲和力、对应抗原的相对分子质量、识别的抗原表位等。

屈保平^[11]在制备柴胡皂苷 c 抗体时,采用聚乙二醇法融合 SP 2/0 细胞与免疫鼠脾细胞,采用有限稀释法筛选阳性单克隆细胞株,并诱导腹水进行抗

体的扩大化生产,用辛酸-硫酸铵法进行抗体纯化。苏歆^[6]采用间接 ELISA 法和间接竞争 ELISA 法对黄芩苷的抗体进行鉴定,小鼠腹水的单抗效价远大于 128 000,灵敏度为 98 ng/mL,且对其他结构类似物显示极低的交叉反应,说明该抗体特异性良好。

4 中药小分子抗原抗体品种

单克隆抗体技术自建立以来,在生命科学领域有着巨大的贡献,近年来也在中医药领域得到了广泛应用。目前在中药小分子单克隆抗体的研究中,处于前沿地位的国际团队有日本长崎国际大学的 Yukihiro Shoyama 团队和大阪大学的 Hiroyuki Tanaka 团队,国内团队有北京中医药大学的屈会化教授团队、厦门大学的徐金森团队等,这些研究团队成果显著,为中医药的发展做出了卓越的贡献。

现将近 20 年已报道且具有代表性的中药小分子的完全抗原、单克隆抗体及多克隆抗体的品种研究情况进行梳理,为今后的研究工作提供参考,具体见表 4。其中,IC₅₀即为灵敏度,是指抑制率为 50%时对应的标准物质量浓度。检测范围是指抑制率为 10%~90%时对应的标准物质量浓度。IC₅₀和

表 4 中药小分子抗原抗体品种

Table 4 Varieties of small molecular antigen-antibody in CMM

偶联方式	中药小分子	IC ₅₀ /(ng·mL ⁻¹)	检测范围/(ng·mL ⁻¹)	参考文献
碳二亚胺法	黄芩苷	98.0	2.66~1 029	6
	大黄酸	185.8	—	19
	丹酚酸 B	17 700.0	—	20
	乌头碱	—	100~1 500	21
	甘草酸	1.1	0.2~5.1	22
	黄连碱	—	1 560~25 000	23
	番泻苷 B	—	0.5~15	24
	薯蓣皂素	—	—	25
活泼酯法	马兜铃酸 A	1.9	0.5~7.5	26
	木犀草苷	42.3	9.1~258.1	27
	绿原酸	0.4	0.1~1.5	27
混合酸酐法	龙胆苦苷	—	—	28
	青蒿素	2.6	0.6~11.5	29
	猪去氧胆酸	390.0	—	30
	槲皮素	—	0.5~50	31
高碘酸钠法	淫羊藿苷	156.0	7.81~1 000	7
	重楼皂苷 III	—	—	10
	柴胡皂苷 c	625.0	156.25~2 500	11
	芍药苷	791.0	—	17
	人参皂苷 Rb ₁	—	50~350	32
	人参皂苷 Re	1.2	0.15~16.1	33
	人参皂苷 Rf	—	0.01~10	34
	人参皂苷 Rg ₁	—	300~1 000	35
	人参皂苷 Rg ₂	28.0	4~128	36
	人参皂苷 Rg ₃	—	0.25~25 000	37
	人参皂苷 Rh ₁	125.0	26~512	36
	三七皂苷 R ₁	—	560~9 000	38
	大豆苷	823.0	—	39
	马钱苷	1 500.0	39~10 000	40
	甘草苷	—	390~25 000	41
	柚皮苷	—	—	42
	栀子苷	—	—	43
	黄芪甲苷	—	50~300	44
	梓醇	100 000.0	—	45
	银杏酸	—	300~1 000	46
	葛根素	—	10~1 000	47
	紫杉醇	—	9.8~312.5	48
	酸枣仁皂苷 A	1.0	—	49
	藏红花素	—	10~200	50
琥珀酸酐法	莪术醇	391.0	160~11 000	51
	川楝素	3.8	1.322~37.530	52
戊二醛法	石杉碱甲	—	5~100 000	53
	苦参碱	—	—	54
重氮化法	大黄素	—	—	55

“—” 未检测

“—” undetected

检测范围皆为抗体的重要评价指标之一。

据不完全统计,目前有 44 种已报道且具有代表性的中药小分子抗原抗体,研究较多的品种为苷类。苷类是由苷元和糖类连接而成,苷元可以是各种类型的天然化合物,且多种中药的有效成分以苷的形式存在。以邻二醇为氧化基团的高碘酸钠法适合于制备苷类小分子,可对氧化邻二醇的位置及数量、偶联反应的投料比等方面做进一步的研究。其中人参皂苷类的抗体已报道 7 种,这些达玛烷型的人参皂苷按结构,可分为原人参二醇型与原人参三醇型。据此,是否可根据小分子的骨架结构进行偶联并免疫,得到对类似骨架结构小分子具有较高特异性的抗体即广谱性抗体,值得深入研究。

然而中药小分子单克隆抗体尚未得到大规模开发,其原因可能如下:一是制备合适的完全抗原较复杂,获得单抗的过程较长,研发经费投入较高;二是该技术是基于抗原抗体的特异性结合,灵敏度高、针对性强,故应用范围受限,是其不足亦是其优势;三是基于中药小分子单抗类产品品种较少,应用形式及市场需求也未得到充分挖掘。

5 结语与展望

中药有效成分结构复杂、类型多样,在制备完全抗原、设计动物免疫方案及建立杂交瘤细胞株等方面有较高的要求。因此,对不同的中药小分子应选择合适的方法进行研究,以提高获得目标抗体的成功率。目前,基于小分子单克隆抗体的免疫分析技术具有多种应用形式^[9],如酶联免疫检测、胶体金试纸条、免疫亲和色谱柱等,可应用于中药真伪鉴定、品质优劣分级、化学成分分离、中药或复方机制研究等方面,还可应用于中药安全性评价,包括有毒有害成分、微生物毒素、农药残留、重金属等检测。

市场上的甘草酸、芍药苷含量快速检测试剂盒及中药材黄曲霉毒素快检试剂盒是通过单克隆抗体及胶体金标记技术,完成药材及其制剂的指标性成分含量及微生物毒素的快速检测,实现从实验室到田间地头、交易市场,从专业人员到普通人员,从高昂检测费到低廉支出的转变,为中药材的指标成分含量、微生物毒素的快速检测提供极大便利。

赵妍^[56]利用基于单克隆抗体的特异性敲除技术,制备芍药苷的免疫亲和柱,解析了芍药苷与芍药甘草汤镇痛作用的相关性。南铁贵等^[26]建立了抗马兜铃酸 A 单抗的酶联免疫分析法,对关木通等 5

种中药材进行检测。文孟棠等^[57]针对抗拟除虫菊酯类农药,制备了其广谱性单克隆抗体,此抗体同时能检测 4 种该类农药。郝代玲等^[58]制备了针对重金属铜离子的单克隆抗体,建立 Cu^{2+} 的间接和直接竞争 ELISA 检测法,实现对 Cu^{2+} 的快速定量测定。

随着中医药行业的发展,生产具有快速、灵敏、精确、简便的中药小分子单克隆抗体相关产品,建立一套操作简单、费用少、仪器依赖性小且易推广的检测方案,在质量控制及中医药的现代化研究中有着极大的优势与广阔的前景。

参考文献

- [1] G. C. 霍华德, M. R. 凯瑟. 抗体制备与使用实验指南 [M]. 北京: 科学出版社, 2010.
- [2] Mercader J V, Suárezpantaleón C, Agulló 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.
- [3] 廖国平, 汪 艳, 陈莉婧, 等. 中药有效成分半抗原抗体制备技术的研究进展 [J]. 中成药, 2011, 33(6): 1025-1029.
- [4] Houérou C L, Bennetau-Pelissero C, Lamothe V, *et al.* Syntheses of novel hapten-protein conjugates for production of highly specific antibodies to formononetin, daidzein and genistein [J]. *Tetrahedron*, 2000, 56(2): 295-301.
- [5] 屈会化, 赵 琰, 李翼飞, 等. 中药活性小分子人工抗原合成的技术要点 [J]. 中草药, 2012, 43(10): 1880-1885.
- [6] 苏 歆. 黄芩苷单克隆抗体的制备及其酶联免疫吸附分析方法的建立 [D]. 北京: 北京中医药大学, 2013.
- [7] 成金俊. 淫羊藿苷单克隆抗体的制备及其 ELISA 法的建立和 FLISA 法的初探 [D]. 北京: 北京中医药大学, 2015.
- [8] 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, 1992.
- [9] 屈会化, 赵 琰, 王庆国. 中药小分子单克隆抗体技术平台的构建 [J]. 中草药, 2014, 45(7): 895-899.
- [10] 秦高凤, 成金俊, 屈保平, 等. 重楼皂苷 III 人工抗原的合成、鉴定及抗血清的制备 [J]. 中华中医药学刊, 2017, 35(7): 1787-1790.
- [11] 屈保平. 柴胡皂苷 c 人工抗原的合成及单克隆抗体的制备 [D]. 北京: 北京中医药大学, 2017.
- [12] 刘轶博. 不同类型佐剂或联合抗原对 BALB/c 小鼠免疫系统的作用 [D]. 北京: 中国食品药品检定研究院, 2015.
- [13] 胡桂学, 徐 浩, 郭 慧, 等. 动物黏膜免疫佐剂研究

- 新进展 [J]. 经济动物学报, 2014, 18(1): 1-4.
- [14] Liu R, Liu Y, Lan M J, *et al.* Evaluation of a water-soluble adjuvant for the development of monoclonal antibodies against small-molecule compounds [J]. *J Zhejiang Univ Sci B*, 2016, 17(4): 282-293.
- [15] 孙凤霞. 三聚氰胺单克隆抗体制备及其高灵敏快速检测技术研究 [D]. 无锡: 江南大学, 2011.
- [16] 徐金森. 芍药苷单克隆抗体的特异性检测 [J]. 厦门大学学报: 自然科学版, 2008, 47(A2): 45-48.
- [17] 屈会化, 赵 妍, 苏 歆, 等. 芍药苷人工抗原的合成与鉴定 [J]. 中国中药杂志, 2014, 39(11): 2043-2046.
- [18] 司徒镇强. 细胞培养 [M]. 西安: 世界图书出版公司, 2007.
- [19] 张 波, 袁 媛, 黄璐琦, 等. 大黄酸人工抗原合成及免疫原性鉴定 [J]. 中国中药杂志, 2015, 40(8): 1463-1467.
- [20] 吴婷婷, 屈会化, 赵 琰, 等. 丹酚酸 B 人工抗原的合成与免疫原性研究 [J]. 北京中医药, 2014, 33(6): 470-473.
- [21] Kido K, Edakuni K, Morinaga O, *et al.* An enzyme-linked immunosorbent assay for aconitine-type alkaloids using an anti-aconitine monoclonal antibody [J]. *Anal Chim Acta*, 2008, 616(1): 109-114.
- [22] Zhao J, Li G, Wang B M, *et al.* Development of a monoclonal antibody-based enzyme-linked immunosorbent assay for the analysis of glycyrrhizic acid [J]. *Anal Bioanal Chem*, 2006, 386(6): 1735-1740.
- [23] Kim J S, Tanaka H, Yuan C S, *et al.* Development of monoclonal antibody against isoquinoline alkaloid coptisine and its application for the screening of medicinal plants [J]. *Cytotechnology*, 2004, 44(3): 115-123.
- [24] Morinaga O, Nakajima S, Tanaka H, *et al.* Production of monoclonal antibodies against a major purgative component, sennoside B, their characterization and use in ELISA [J]. *Analyst*, 2001, 126(8): 1372-1376.
- [25] 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.
- [26] 南铁贵, 何素平, 谭桂玉, 等. 中药致肾毒性成分马兜铃酸 A 单抗制备及酶联免疫分析方法的建立 [J]. 分析化学, 2010, 38(8): 1206-1210.
- [27] 张 波. 基于单克隆抗体的金银花指标性成分快速检测技术研究 [D]. 济南: 山东中医药大学, 2016.
- [28] 钱卫东, 吴启航, 刘婵婵, 等. 龙胆苦苷人工抗原的合成与鉴定 [J]. 时珍国医国药, 2017, 28(7): 1651-1655.
- [29] 郭素琴. 青蒿素类药物特异性单克隆抗体的制备及快速免疫检测方法的建立与应用 [D]. 北京: 中国农业大学, 2016.
- [30] 赵 妍, 屈会化, 张 越, 等. 猪去氧胆酸人工抗原的合成及鉴定 [J]. 中草药, 2014, 45(23): 3387-3391.
- [31] 姜 玲, 章文才, 柯 云, 等. 抗槲皮素抗体的研制 [J]. 免疫学杂志, 2000, 16(5): 383-386.
- [32] 侯春喜. 人参皂苷 Rb₁ 多克隆抗体与单克隆抗体的制备及鉴定 [D]. 长春: 吉林大学, 2006.
- [33] Nan T G, Wu S Q, Zhao H W, *et al.* Development of a secondary antibody thio-functionalized microcantilever immunosensor and an ELISA for measuring ginsenoside Re content in the herb ginseng [J]. *Anal Chem*, 2012, 84(10): 4327-4333.
- [34] Nah J J, Sonog 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.
- [35] 刘 洋, 屈会化, 任 燕, 等. 人参皂苷 Rg₁ 人工抗原的合成及免疫原性鉴定 [J]. 中草药, 2013, 44(13): 1738-1742.
- [36] 王 艳. 人参皂苷 Rh₁/Rg₂ 单克隆抗体的制备及酶联免疫吸附分析方法的建立 [D]. 北京: 北京中医药大学, 2014.
- [37] Eunji J, Youngwan H, Heungsop S, *et al.* Generation and characterization of monoclonal antibody to ginsenoside Rg₃ [J]. *Biol Pharm Bull*, 2009, 32(4): 548-552.
- [38] Limsuwanchote S, Wungsintaweekul J, Yusakul G, *et al.* Preparation of a monoclonal antibody against notoginsenoside R₁, a distinctive saponin from *Panax notoginseng*, and its application to indirect competitive ELISA [J]. *Planta Med*, 2014, 80(4): 337-342.
- [39] 贺娜娜, 屈会化, 冯会宾, 等. 基于抗大豆苷单克隆抗体的 Ic-ELISA 方法的建立 [J]. 药物分析杂志, 2015, 35(4): 587-590.
- [40] 迪更妮, 张维库, 李 壮, 等. 马钱苷人工抗原的合成、鉴定及免疫原性的初步研究 [J]. 中草药, 2015, 46(19): 2870-2873.
- [41] Fujii S, Morinaga O, Uto T, *et al.* Development of a monoclonal antibody-based immunochemical assay for liquiritin and its application to the quality control of licorice products [J]. *J Agric Food Chem*, 2014, 62(15): 3377-3383.
- [42] Qu H, Wang X, Qu B, *et al.* Sandwich enzyme-linked immunosorbent assay for naringin [J]. *Anal Chim Acta*, 2016, 903: 149-155.
- [43] 屈会化, 张桂亮, 赵 琰, 等. 梔子苷人工抗原的合成与鉴定 [J]. 北京中医药大学学报, 2013, 36(6): 387-392.

- [44] 于生兰, 欧阳臻, 徐加兵, 等. 黄芪甲苷单克隆抗体的制备及鉴定 [J]. 天然产物研究与开发, 2013, 25(11): 1568-1571.
- [45] 李 壮, 张维库, 张 越, 等. 梓醇人工抗原的合成、鉴定及免疫原性的初步研究 [J]. 中国中药杂志, 2015, 40(7): 1287-1290.
- [46] Lounggratana P, Tanaka H, Shoyama Y. Production of monoclonal antibody against ginkgolic acids in *Ginkgo biloba* Linn. [J]. *Am J Chin Med*, 2004, 32(1): 33-48.
- [47] Qu H, Zhang G, Li Y, *et al.* Development of an enzyme-linked immunosorbent assay based on anti-puerarin monoclonal antibody and its applications [J]. *J Chromatogr B*, 2014, 953/954(1): 120-125.
- [48] 谭铭铭. 紫杉醇单克隆抗体的制备与应用 [D]. 广州: 南方医科大学, 2012.
- [49] 迪更妮, 张维库, 乔灏祯, 等. 酸枣仁皂苷 A 人工抗原的制备及鉴定 [J]. 中国中药杂志, 2016, 41(10): 1880-1883.
- [50] Xuan L, Tanaka H, Xu Y, *et al.* Preparation of monoclonal antibody against crocin and its characterization [J]. *Cytotechnology*, 1998, 29(1): 65-70.
- [51] 黄凤香, 王 娟, 曾建红, 等. 莪术醇酶联免疫检测方
法 (ELISA 法) 的建立 [J]. 江苏农业学报, 2013, 29(6): 1468-1471.
- [52] 张 静. 川楝素免疫分析方法及其应用研究 [D]. 杨凌: 西北农林科技大学, 2008.
- [53] 余宇燕, 滕海英, 张红艳, 等. 石杉碱甲多克隆抗体的制备及酶联免疫检测方法的建立 [J]. 时珍国医国药, 2012, 23(10): 2440-2442.
- [54] 李 颖, 马志卿, 冯俊涛, 等. 苦参碱人工抗原的合成与鉴定 [J]. 西北农林科技大学学报: 自然科学版, 2012, 40(9): 96-102.
- [55] 李丽华, 刘文泰, 戴 军, 等. 大黄素-BSA 不同表位构型的免疫原性和特异性研究 [J]. 中国免疫学杂志, 2011, 27(5): 419-422.
- [56] 赵 妍. 利用基于单克隆抗体的特异性敲除技术解析芍药苷与芍药甘草汤镇痛作用的相关性研究 [D]. 北京: 北京中医药大学, 2016.
- [57] 文孟棠, 刘 媛, 闫 帅, 等. 抗拟除虫菊酯类农药广谱性单克隆抗体的研制及鉴定 [J]. 分析化学, 2014, 42(9): 1245-1251.
- [58] 郝代玲, 黄建芳, 杨 浩, 等. 重金属铜的单抗的制备及免疫学检测方法的建立 [J]. 食品工业科技, 2017, 38(19): 245-248.