

• 专论与综述 •

分子模拟在农药半抗原设计及其免疫识别机制中的应用

刘毅华, 朱国念*, 桂文君

(浙江大学 农药与环境毒理研究所, 杭州 310029)

摘要: 免疫半抗原的分子设计与合成是建立小分子免疫化学分析方法的关键步骤。在介绍农药半抗原设计一般策略的基础上, 指出分子模拟技术在农药半抗原合理设计中的适用性在于其能够通过分子结构和动力学行为的模拟, 获得能表示和解释农药分子免疫原性和生物活性的参数。重点阐述了分子模拟在免疫原和竞争原设计中的应用, 揭示了采用分子模拟技术进行半抗原设计的优势在于其能够克服目前半抗原设计方法的经验性和主观随意性。运用分子模拟技术能够更好地研究抗原抗体反应中的分子间作用力, 因此该技术有利于促进抗原抗体反应识别机制研究的深入进行。分子模拟技术还能够应用于解释抗体的交叉反应率, 从而能应用于提高抗体宽谱性研究。

关键词: 分子模拟; 农药; 半抗原; 免疫分析

中图分类号: O641

文献标志码: A

文章编号: 1008-7303(2007)03-0201-08

Application of Molecular Modeling for the Hapten Design in the Immunochemical Analysis of Pesticide Residue and Immune Recognition Mechanism

LIU Yi-hua, ZHU Guo-nian*, GUI Wen-jun

(Institute of Pesticide and Environmental Toxicology, Zhejiang University, Hangzhou 310029, China)

Abstracts The hapten design and synthesis are the key steps for the development immunochemical method of pesticide residue. Based on the recent publications, the general strategy of hapten designing was summarized. The applicability of molecular modeling in hapten design was pointed out. Molecular modeling could simulate the molecular structure and dynamic behavior from which the immunological and biological properties of pesticide could possess. The application of molecular modeling in immunogen and competitor design was emphasized. The advantage of the application of molecular modeling was revealed. It is concluded that the application of molecular modeling in hapten design could overcome the empiricism and subjectivity of the conventional method. In addition, the recognition mechanism of immuno reaction was also discussed. The improvement of broad specificity of antibody came from the application of molecular modeling.

Key words molecular modeling; pesticide; hapten; immuno assay

收稿日期: 2007-02-01; 修回日期: 2007-04-09

作者简介: 刘毅华 (1981-), 女, 湖南永州人, 博士研究生, 主要从事农药免疫化学分析研究; * 通讯作者 (Author for correspondence): 朱国念 (1957-), 男, 浙江诸暨人, 博士, 教授, 主要从事农药残留检测和毒理学研究. 联系电话: 0571-86971220 E-mail: zhugn@zju.edu.cn

基金项目: 国家自然科学基金项目 (30370944); 教育部博士点基金项目.

免疫分析 (Immunoassay, IA) 是利用抗原抗体之间特异性的结合反应对化合物进行检测的分析技术。由于其无需昂贵的仪器设备、操作简便快捷,因而在农产品农药残留现场筛选和大量样本的快速监测中显示出独特优势。影响免疫分析质量的根本因素是抗体的选择性(或特异性)与亲和性,而这些性质又取决于免疫半抗原分子的结构。因此,免疫半抗原的分子设计与合成是建立小分子免疫化学分析方法的关键步骤^[1~3]。农药分子的半抗原设计要求既要保留农药分子的基本结构特征,又要使其能够很好地与载体蛋白结合,这往往需要设计多个目标分子以进行优化选择,不仅工作量大、周期长、成本高,而且许多设计的目标分子还难以合成。

目前在有关农药和一些小分子化合物的免疫分析方法的研究中,对于免疫原的合成多是采用将待测物衍生化的方法制备;或是在化合物容易进行化学改造的部位引入连接臂从而形成半抗原^[2~4]。这些设计方法均带有很大的经验性和随意性,其形成的抗体往往对目标农药的亲合力较低,特异性较差,而亲和力低、特异性差的抗体在对实际环境样品进行检测时会因受其他结构类似物的干扰而无法使用免疫分析方法准确定量。针对这一问题,近年来研究者不断将一些新的设计手段引入到农药半抗原的合理设计中,同时在对抗原抗体免疫化学反应的识别机制方面做了一些工作,其中又以运用分子模拟方法取得的成果最为突出。

1 半抗原分子设计的一般策略

1.1 半抗原的内涵

半抗原(Hapten)是指与目标分析物的结构相同或相似,并具有反应活性基团的低分子质量的有机物。在化合物的活性基团上通过一定的化学方法连接一个具有一定碳链长度的间隔臂,间隔臂的另一端具有氨基、羧基、巯基等活性基团,以便与载体蛋白质上游离的羧基、氨基以共价键相偶联,偶联物应突出目标分析物的结构或空间构型,即突出抗原决定簇。也有研究者将包含间隔臂在内的目标化合物(或其类似物)称为半抗原。

1.2 半抗原的分类

从用途上可将半抗原分为免疫半抗原、包被半抗原和酶标半抗原。免疫半抗原主要是与合适

的蛋白质偶联,获得人工完全抗原最终制备抗体;包被半抗原是通过与相应蛋白质偶联后成为免疫分析中的包被抗原;酶标半抗原是用于采用包被抗体方式的免疫分析中,待测物和酶标半抗原对包被的抗体进行竞争结合,常用的标记用酶是HRP(辣根过氧化物酶)或AP(碱性磷酸酶)。包被半抗原和酶标半抗原又统称为竞争原(Competitor)。

1.3 半抗原的分子设计原则

对于竞争原的设计,由于其影响因素比较复杂,目前还未形成一定的经验规律。而对于免疫半抗原的认识已经基本形成共识:理想的半抗原一方面应具备待测物的特征结构、特别是立体化学特征;另一方面半抗原与载体连接后应保证待测物的特征结构能最大程度的被免疫活性细胞所识别并结合,从而制备出具有预期选择性的抗体。许多研究者的研究结果表明^[3~8],免疫半抗原的分子设计应遵循以下几个基本原则:

(1)应考虑到农药原型和有毒理学意义的代谢物。在农药开发过程中一般有大量的前体化合物或类似物被合成,有些亦可作为潜在的半抗原,以便进行进一步结构修饰。设计中应突出农药特定的结构,或一类农药中共有的结构部分,在半抗原结构的末端需有可直接与载体蛋白质偶联的活性基团(NH_2 , COOH , OH , SH 等)。

(2)在活性基团与载体之间一般需要有间隔臂,以便使半抗原突出于载体表面而易被机体免疫系统识别。由于免疫系统对载体远端的结构识别能力最强,所以间隔臂应远离待测物的特征结构部分和官能团,以便制备高选择性和高亲和性的抗体。间隔臂的长度一般以含4~6个碳原子为宜,碳链太短则会因载体的空间位阻过大而影响免疫系统对半抗原的识别,过长则可能因氢键(某些极性间隔臂)或疏水作用(非极性间隔臂)使半抗原产生“折叠”。应尽可能避免间隔臂中含有较强的决定簇(如芳环、共轭双键或杂原子等),通常以末端含活性基团的烷基链为宜,以减少所产生的抗体对间隔臂的过度识别而降低对目标分子的识别能力。对于结构类似的化合物,应当选择在其相同结构(或类似结构)的位置上连接间隔臂,以最大限度地暴露分子的特征部位(决定簇)。

(3)半抗原的结构不仅需要在实验室条件下具有一定的稳定性,在动物体内也应有一定的稳定性,这样才能有效地刺激动物产生对目标分析

物具一定特异性和亲和力的抗体。

2 分子模拟技术在半抗原设计中的应用

2.1 分子模拟在半抗原设计中的适用性

分子模拟 (Molecular modeling) 是以量子化学、统计力学为理论基础的一门新兴学科, 主要用于计算分子的性质、模拟分子聚集体的行为, 从而计算分子系统的宏观性质。即通过对分子的结构和动力学行为进行模拟, 为阐明分子的结构和生物功能提供丰富信息^[9]。一般来说, 用实验方法获取这些信息比较困难, 但通过分子模拟技术能够获得一些重要参数^[9~11], 如 pH 值和溶剂对半抗原性质的影响等。Szundoki 等^[12]在对除草定的免疫分析方法的研究中, 强调了半抗原合理设计的必要性, 同时阐述了半抗原设计的一般性原则和方法, 提出只要该方法能提供目标分析物的物理、化学性质方面的有用信息, 都能为获得特异性抗体的半抗原设计提供辅助, 而分子模拟就是这样一种手段。因为分子是物质的基础结构, 化合物内部分子结构特征及分子间的组合方式等信息决定了化合物所表现的性质, 也就是说, 化合物的理化性质、生物活性及免疫原性等都是以分子为主体来表示和解释的。目前分子模拟技术已成为研究分子结构和功能的一种重要手段, 将其应用于半抗原设计的报道也日益增多^[7~12]。

2.2 分子模拟在同源分析免疫原设计中的应用

同源分析 (Homologous assays), 是指用同一种半抗原制备的人工抗原与相应的抗体进行的免疫分析, 也是在农药免疫分析及其试剂盒开发中最常用的方法。目前对于同源分析中免疫原的设计多采用“试错法”, 即采用预先设计的几个半抗原免疫动物, 通过获得的抗体来评价半抗原的优劣。该方法工作量大, 需要依靠经验进行设计, 偶然性比较大。针对这一问题, 有研究者^[13~17]根据抗原-抗体之间的识别作用是基于由分子的电子特性所决定的原子空间排列及其相互作用, 提出了一个合理假设 (假说), 认为若化合物与偶联物抗原决定簇部分的结构相似度越高, 则该化合物与相应抗体之间的亲和力越好。从而可以通过比较偶联物相应区域与待分析物的空间结构及电子构型来进行半抗原设计, 并通过 PCA (Principal component analysis 主成分分析) 来确定最佳半抗原, 以获得高特异性的抗体。Nathalie 等^[13]采用此

方法对三嗪类化合物进行了研究, 先计算基于莠灭净 (an etryn) 设计的免疫原 (I based on an etryn) 与其他三嗪类农药的电子分布以及分子体积 (见图 1), 再进行 PCA 分析 (见图 2)。图 2 中的 K1F4 是基于莠灭净设计的免疫原。从 PCA 图可以明显看出与免疫原相似度高的是扑草净 (prom etryn)、莠去津 (atrazine), 其次是扑灭津 (propazine)、特丁净 (terbutryn)、另丁津 (sebuty lazine) 等。Nathalie 指出农药分子与免疫原距离越近, 即分子间相似度越高, 则相应的农药与免疫原产生的抗体之间亲和力越高。进一步的免疫实验证实了该结论。

2.3 分子模拟在异源分析的竞争原设计中的应用

异源分析 (Heterologous assay) 是指由同一种分析物的不同半抗原所得的抗体分别与不同半抗原所制备的包被原或标记抗原进行的免疫分析。其中采用的与免疫原不同的半抗原即是竞争原, 包括包被半抗原与酶标半抗原。Yoo^[18]在对倍硫磷的 ELISA (Enzyme-linked immunosorbent assay, 酶联免疫吸附测定) 研究中发现: 为提高 ELISA 方法的灵敏度, 应优先考虑包被原的结构异源性而非间隔臂长短, 因为后者对提高灵敏度影响不大。Hammock 等^[19]研究指出在酶标半抗原中仅一个甲基的差异就能使方法的灵敏度提高 8 倍。包被原采用与免疫原不同的结构, 在于异源半抗原常常能解决抗体与间隔臂的高亲和性问题, 而这种高亲和能力的存在常常导致抗体对待检测农药的不识别或者识别效率差。异源性包被原的使用能因抗体对异源包被原的弱识别性 (相对抗体对目标农药的识别而言) 而间接提高抗体对待检测农药的结合能力。如何找到结构适宜的竞争原已成为发挥异源分析优越性的关键所在, 分子模拟技术即是较好解决这一问题的手段之一。

Roger Galve 研究小组近年来利用分子模拟技术对氯苯酚类化合物的半抗原设计进行的系列研究^[20~22]最为有代表性和系统性。他们设计了 3 种半抗原并对 2, 4, 6-TCP (2, 4, 6-三氯苯酚) 进行免疫分析, 结构式见图 3。通过 Hyperchem 优化分子构型, 得到了能量最低的分子构象 (MNDO + PM 3) 后计算了分子总电荷 (Total charge), 然后通过 ACD /K a 1. 2 计算 pK a 值。另外为了从热力学角度比较半抗原之间的差异, 计算了每个半抗原的两种生成焓: $\Delta H_f(A-OH)$ 、 $\Delta H_f(A-O^-)$, 以

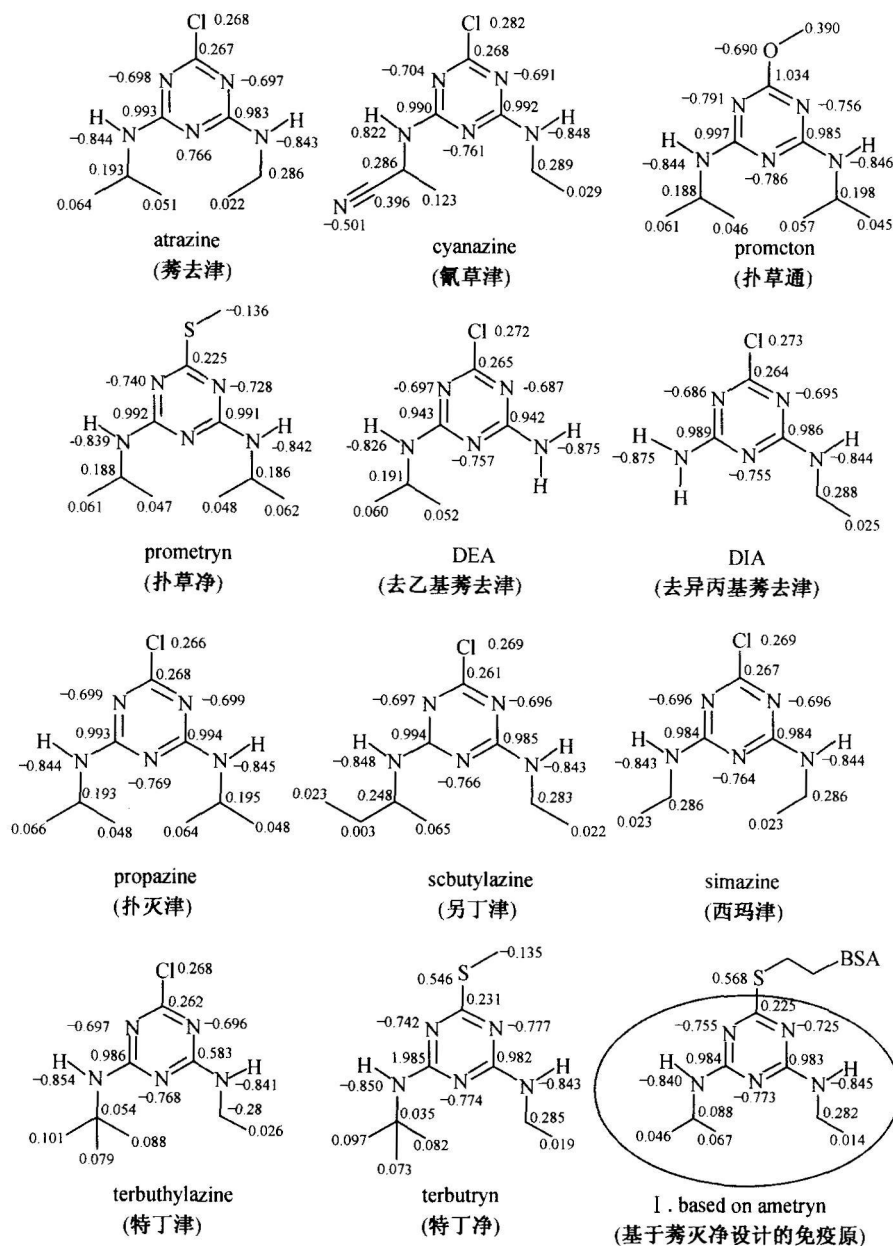


图 1 免疫原和其他三嗪类农药的电荷分布

Fig 1 Charge distribution of imm unogen and triazines

及去质子化作用的焓变 (deprotonation enthalpies DPE)。各项指标的计算结果见表 1。通过这种分子模拟分析, Hapten A 由于各项指标与待分析物相似度最高而被认为是最佳免疫原, 同时通过免疫实验验证了该结论。

在选定最佳免疫半抗原结构的基础上, Galve 又设计了 5 个竞争原结构 (见图 4), 并将比 Hapten A 的间隔臂少一个碳原子的半抗原 Hapten 5 同时作为免疫半抗原用以制备抗体。通过分子模拟的方法对设计的竞争原与分析物 (2,4,6-TCP) 的异

质性差异进行了比较, 参数采用几何结构参数和电荷参数, 各项参数的计算结果见表 2。采用分子模拟方法对异质性的计算结果为: Hapten 2 > Hapten 1 > Hapten 3 > Hapten 4 > Hapten 5。而 ELISA 试验结果表明: 免疫原与竞争原的异质性最高的组合免疫分析方法最佳, 即 Hapten 5 (免疫原) / Hapten 2 (竞争原) 的组合最佳; 两者之间的异质性与分方法的表现 (灵敏度、特异性) 有一定的相关性。在此基础上, Galve 等又采用分子模拟方法对 2,4,5-三氯苯酚的 3 种半抗原构型 / 电子

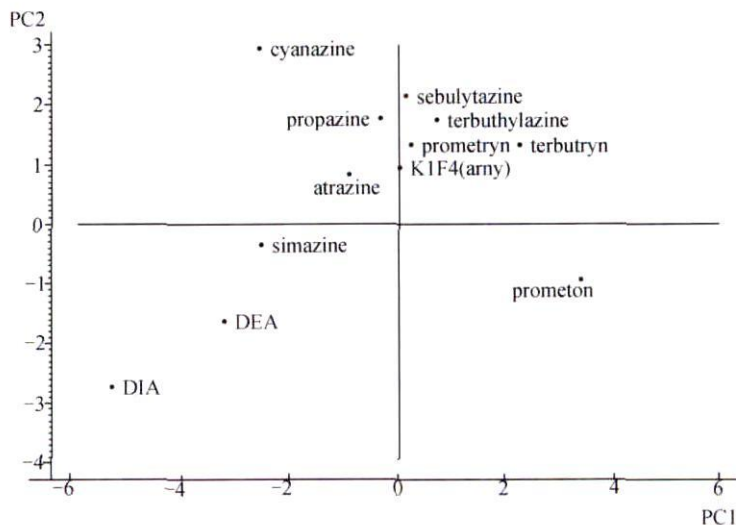


图 2 基于莠灭净设计的免疫原 (K1F4) 和三嗪类农药的主成分分析 (PCA) 结果

Fig 2 Distribution obtained by PCA of the ametryn-based immunogen (K1F4) and triazines in the plane of the first two principal components

结构 /pKa 值进行了分析计算, 更进一步增加了对竞争抗原的分子建模分析, 从理论角度研究了何种竞争物有利于免疫分析。结果表明: 竞争物与待分析目标化合物若有中等-高的同质性 (Homology) 则有利于进行免疫分析; 同时也要考虑其他决定抗体识别竞争原的影响因素, 以及竞争原结构的亲水性 /憎水性、与竞争半抗原偶联的蛋白质性质、竞争原的结合比等。对 2,4,5-三氯苯酚的研究再次证明: 若竞争物与蛋白质结合呈现中等结合比 (半抗原密度) 则有利于免疫分析方法中最小检出量的提高 (即灵敏度提高)。

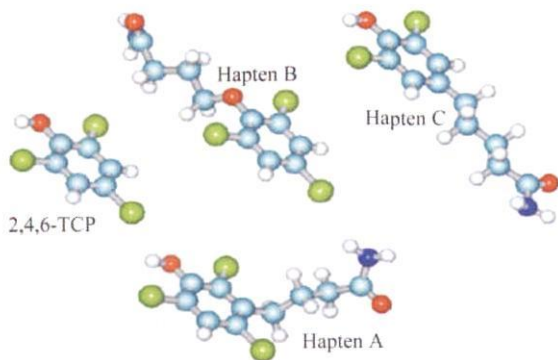


图 3 2,4,6-TCP 及其 3 种免疫半抗原的结构式

Fig 3 Chemical structure of 2,4,6-TCP and three haptens

注: 图中蓝色原子代表碳原子, 绿色代表氯原子, 红色代表氧原子, 白色代表氢原子。

Note: The elements were presented in the following manner: light blue carbon, green chlorine, red oxygen, white hydrogen.

3 分子模拟在免疫识别机制中的应用

3.1 在抗原抗体反应机理研究中的应用

Newman 和 Price^[23] 对抗原-抗体之间结合的分子机理、尤其针对小分子进行了较为深入的研究。他们采用分子模拟方法研究了化合物的三维构型、疏水性、电子特性等能够影响抗原-抗体分子间作用力 (主要是氢键、范德华力、疏水作用、静电势) 的因素, 以便能更好地了解抗原-抗体之间的作用机理, 同时提出免疫分析与数学和统计学工具相结合将大大提高半抗原筛选的工作效率。Hammock 的研究小组在这方面取得非常突出的成果^[24-26], 他们研究了包被原和免疫原间隔臂长度和引入位点的异源性对杀虫剂苯甲酰苯基脲 (benzoylphenylurea) ELISA 方法灵敏度和特异性的影响。结果表明不同结构免疫原和包被原的组合能够提高检测的灵敏度, 而且间隔臂引入位点的异源分析要比改变臂长度的异源分析灵敏得多。进一步研究某种农药在其所属类别其他农药存在情况下的 ELISA 分析方法, 即拟通过半抗原的设计来降低交叉反应率。他们以三嗪类农药为研究对象, 通过试验提出了一条半抗原设计规则, 即除与目标分析物共有的结构外, 半抗原中其余结构均应比目标分析物的相应基团小, 这样产生的多克隆抗体能够识别并排除比目标分子大的其他化合物 (同系)。同时解释了采用异源包被原的

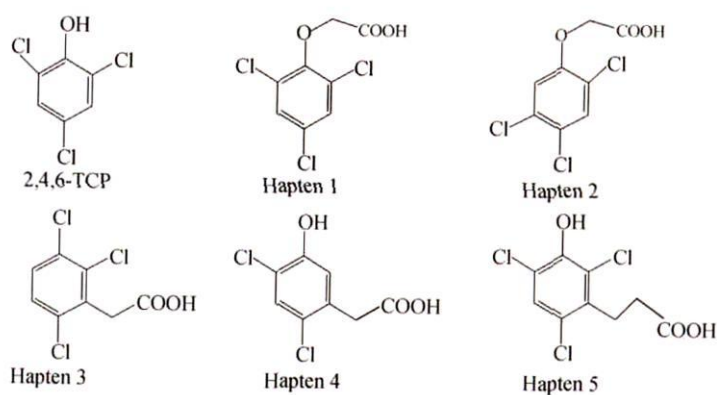


图 4 2,4,6-TCP 的 5 个竞争原结构

Fig 4 Chemical structure of 2,4,6-TCP and five competitors

表 1 2,4,6-TCP 及其 3 种免疫半抗原的 DPE、pKa 和总电子计算结果

Table 1 Calculated DPE and pKa values of 2,4,6-TCP and three haptens

化合物 Compounds	$\Delta H_f(ArOH)/(kJ/mol)$	$\Delta H_f(ArO^-)/(kJ/mol)$	DPE/(kJ/mol)	pKa	总电荷 Total charge
2,4,6-TCP	-5745	-5699	1582	6.59	-0.12
Hapten A	-11037	-11008	1565	6.63	-0.13
Hapten B*	/	/	/	/	0.11
Hapten C	-12288	-12226	1602	7.37	-0.23

* Hapten B 由于间隔臂设计在氧原子上, 因此不存在质子化和去质子化形式。
* The bridge of hapten B was introduced through the oxygen atom, there was no protonation and deprotonation.

表 2 2,4,6-TCP 与竞争原的几何结构参数和电子参数

Table 2 Geometry and charge distribution parameters of 2,4,6-TCP and competitors

半抗原 Hapten s	几何结构 参数 G eom etry			电荷分布 Punctual charge distribution			pK a
	pH < pK a	pH > pK a	pH = 7. 5	pH < pK a	pH > pK a	pH = 7. 5	
1	0. 415	0. 040	0. 057	0. 121	0. 607	0. 554	/
2	0. 519	0. 331	0. 352	0. 150	0. 606	0. 556	/
3	0. 237	0. 255	0. 255	0. 286	0. 286	0. 468	7. 99
4	0. 258	0. 282	0. 278	0. 285	0. 287	0. 286	6. 64
5	0. 164	0. 170	0. 169	0. 090	0. 029	0. 036	6. 63
TCP	/	/	/	/	/	/	6. 59

ELISA 能产生更低 IC₅₀ 与 LLQ (Lowest level of quantification) 值的原因在于: 当目标待测农药 (A) 与抗体 (Y) 的亲常数 K_A 固定时, 应选择异源包被原以减少包被原 (H) 与抗体 (Y) 的亲常数 K_{CH}, 使 K_A >> K_{CH}。

3.2 分子模拟在改进抗体宽谱性中的应用

目前, 分子模拟的方法已经成为解释抗体交叉反应率结果的辅助工具, 这些交叉反应率常常是试验前没有预计到的。通过使用分子模拟的方法对交叉反应试验结果进行分析, 能够帮助改进

半抗原设计, 从而进一步提高抗体的亲和力和特异性。在一些研究中, 分子模拟技术帮助研究者提高了抗体的宽谱性, 为多残留免疫检测方法的发展提供了一条新的思路^[27~30], 这也是分子模拟技术在半抗原设计中未来的发展热点。

较早将分子模拟技术应用于小分子多残留半抗原设计中的研究者 Paul^[31] 试图采用半抗原设计方法的数学模型化提高抗体特异性宽度, 尝试将抗体的产生从“经验”方法发展成一种更能“预测”的科学, 即向理论指导试验方向发展。先用分子

模拟的方法考察了半抗原与目标化合物的构型和电子特性的异同, 预测了产生宽谱特异抗体的半抗原结构, 即与待分析的化合物有共同结构, 而非单个化合物的特异结构, 然后通过免疫试验证明了这个预测; 同时对土壤样品中的三硝基甲苯进行了测定, 并将结果与色谱测定结果进行了比较, 说明分子模拟技术与免疫方法的结合是测定三硝基甲苯及其代谢产物快速、有效的方法。Spinks等^[32]通过分子模拟研究很好地解释了抗氨基磺胺(sulphonamide)的抗体的特异性比其预计高很多的原因, 在于设计的半抗原对目标化合物的决定簇部分模拟程度高。Mulloon等^[33]也获得了相似的结果, 制备了针对磺胺二甲氧基嘧啶(sulfadimethoxine)的7种单克隆抗体, 每一种都有不同的交叉反应率。通过对交叉物的分子模拟, 研究得出抗体与交叉物之间的结合主要受分子立体效应和电性效应的影响。这些研究表明: 在同时进行几种分析物的多残留免疫分析方法中, 分子模拟技术的优势是显而易见的, 该方法能够为半抗原设计、半抗原对载体分子结合位点的识别提供大量的信息。

4 展望

随着免疫分析方法的大规模应用, 尤其是快速检测手段的使用, 通过半抗原的合理设计来获得高质量的抗体是分析方法成功的第一步, 也是关键的一步。而如何快速、准确地设计出所需要的半抗原就成为至关重要的问题。摆脱传统方法的盲目性和随意性, 通过分子模拟的手段对半抗原进行合理设计, 不仅能找到针对目标化合物的最佳半抗原, 更大的优势在于通过比较半抗原与目标化合物的电子构型和优势构象之间的相似度, 能够找到产生高特异性(单一目标物)和宽谱特异性(多个目标物)抗体的对应半抗原的结构特点。从而通过分子模拟的方法能够为半抗原设计提供大量的信息, 这已经在抗原抗体的识别机制的研究中获得了证明。进而可以将其他研究手段与分子模拟方法相结合, 深入研究半抗原分子的合理设计, 获得分子合理设计的一般路线, 建立农药半抗原分子设计的基本模型, 然后结合实验研究, 确立农药半抗原分子设计及其免疫识别机制的一般规律, 获得具有免疫识别预测能力的QSAR(Quantitative structure-activity relationship)模型。

这将有助于建立一套较完善的农药残留免疫化学分析方法的基本理论, 对于进一步开发具有自主知识产权的农药残留免疫化学分析试剂盒有着重要的实际意义。

参考文献:

- [1] AMY L O, ERIC D H, BRENT L. An Investigation of Antibody Acyl Hydrolysis Catalysis Using a Large Set of Related Haptens [J]. *Bioorganic Med Chem*, 2000 8(2): 413-426
- [2] PATRICIA V B, AUDREY F A, RAY T, et al. Preparation of Monoclonal Antibodies Reactive to the Endogenous Small Molecule Anandamide [J]. *J Immunol Methods*, 2004, 285(2): 181-195
- [3] SHI Hai-yan (施海燕), WU Hui-ming (吴慧明), CHENG Jing-li (程敬丽), et al. 2甲4氯人工抗原的合成与鉴定 [J]. *Chin J Pestic Sci (农药学报)*, 2004 6(2): 20-24
- [4] GUI Wen-jun (桂文君), JIN Ren-yao (金仁耀), HUANG Ya-li (黄雅丽), et al. 毒死蜱多克隆抗体的制备 [J]. *Chin J Pestic Sci (农药学报)*, 2006 8(2): 109-114
- [5] ZHU G N, GUI W J, ZHENG Z T, et al. Synthesis and Identification of Artificial Antigen for Imidacloprid [J]. *Agric Sci China*, 2006 5(4): 307-312
- [6] GUI W J, JIN R Y, CHEN Z L, et al. Hapten Synthesis for Enzyme Linked Immunoassay of the Insecticide Triazophos [J]. *Anal Biochem*, 2006 357(1): 9-14
- [7] OLGA D H, ANATOLY V Z, ALEXANDER P K, et al. Experimental Study and Mathematical Modeling of the Interaction between Antibodies and Antigens on the Surface of Liposomes [J]. *Molecular Immunol*, 2002 39(7-8): 413-422
- [8] ZHANG W, FENG J N, LI Y, et al. Humanization of an Anti-human TNF Antibody by Variable Region Resurfacing with the Aid of Molecular Modeling [J]. *Molecular Immunol*, 2005 42(12): 1445-1451.
- [9] ZHU C S, LU X S, FENG J, et al. Characterization of the Neutralizing Activity of Three Anti-human TNF Monoclonal Antibodies and Prediction of their TNF Epitopes by Molecular Modeling and Mutant Protein Approach [J]. *Immunol Letters*, 2006 102(2): 177-183
- [10] LI Y, HEW Y, LU H X, et al. Daidzein Interaction with Human Serum Albumin Studied Using Optical Spectroscopy and Molecular Modeling Methods [J]. *J Molecular Structure*, 2007, 831(1-3): 144-150.
- [11] EFREMOV R G, CHUGUNOV A O, PYRKOV T V, et al. Molecular Lipophilicity in Protein Modeling and Drug Design [J]. *Curr Med Chem*, 2007 14(2): 393-415
- [12] SPINK S C. Broad-specificity Immunoassay of Low Molecular Weight Food Contaminants: New Paths to Utopia [J]. *Trends Food Sci Tech*, 2000 11(2): 210-217.
- [13] NATHALIE D B, VALERE P, MARE C H. Experimental

- Comparison of Three Monoclonal Antibodies for the Class-selective Immunoextraction of Triazines Correlation with Molecular Modeling and Principal Component Analysis Studies [J]. *J Chromatogr A*, 2003, 999(1-2): 3-15
- [14] LI Y, HE W Y, DONG Y M, et al. Human Serum Albumin Interaction with Formononetin Studied Using Fluorescence Anisotropy, FT-IR Spectroscopy, and Molecular Modeling Methods [J]. *Bioorganic Med Chem*, 2006, 14(5): 1431-1436.
- [15] SEBASTIEN M B M, CHRISTELLE J C, NATACHA B, et al. Improvement of Collagen-induced Arthritis by Active Immunization Against Murine IL-1 β Peptides Designed by Molecular Modeling [J]. *Vaccine*, 2005, 23(3): 4228-4235.
- [16] STENT S BJORN O B, ARNE S, et al. The Primary Structure and Specificity Determining Residues Displayed by Recombinant Salmon Antibody Domains [J]. *Molecular Immunol*, 2004, 40(7): 1347-1360.
- [17] ZHU C S, LIU X S, FENG J N, et al. Characterization of the Neutralizing Activity of Three Anti-human TNF Monoclonal Antibodies and Prediction of their TNF Epitopes by Molecular Modeling and Mutant Protein Approach [J]. *Immunol Letters*, 2006, 102(2): 177-183.
- [18] YOO J K, YOUNG A C, HYE S L, et al. Synthesis of Haptens for Immunoassay of Organophosphorus Pesticides and Effect of Heterology in Hapten Spacer Arm Length on Immunoassay Sensitivity [J]. *Anal Chim Acta*, 2003, 475(6): 85-96.
- [19] GOODROW M H, HARRISON R O, HAMMOCK B D. Hapten Synthesis, Antibody Development and Competitive Inhibition Enzyme Immunoassay for S-Triazine Herbicide [J]. *J Agric Food Chem*, 1990, 38(4), 990-996.
- [20] ROGER G, FRANCISCO C, FRANCISCO S B, et al. Development of an Immunochemical Technique for the Analysis of Trichlorophenols Using Theoretical Models [J]. *Anal Chem*, 2000, 72(9): 2237-3346.
- [21] ROGER G, FRANCISCO S B, FRANCISCO C, et al. Indirect Competitive Immunoassay for Trichlorophenol Determination. Rational Evaluation of the Competitor Heterology Effect [J]. *Anal Chim Acta*, 2002, 452(2): 191-206.
- [22] M K A E L A N, ROGER G, PILAR M. Biological Monitoring of 2,4,5-Trichlorophenol (I): Preparation of Antibodies and Development of an Immunoassay Using Theoretical Models [J]. *Chen Res Toxicol*, 2002, 15(6): 1360-1370.
- [23] NEWMAN D J, PRICE C P. Molecular Aspects of Design of Immunoassays for Drugs [J]. *Therapeutic Drug Monitoring*, 1996, 18(3): 493-497.
- [24] PETER S, BRUCE D H. Influence of the ELISA Format and the Hapten-enzyme Conjugate on the Sensitivity of an Immunoassay for S-Triazine Herbicide Using Monoclonal Antibodies [J]. *J Agric Food Chem*, 1992, 40(3): 525-530.
- [25] SONG I W, BRUCE D H. Comparison of Coating and Immunizing Antigen Structure on the Sensitivity and Specificity of Immunoassays for Benzoylphenylurea Insecticides [J]. *J Agric Food Chem*, 1994, 32(8): 1294-1301.
- [26] TAKAHASHI W, GUO M S, DONAHUE S, et al. Development of a Class-specific Immunoassay for the Type I Pyrethroid Insecticides [J]. *Anal Chim Acta*, 2001, 444(1): 119-129.
- [27] SALLY K M, GUO M S, HU J L, et al. Development of a Class Selective Immunoassay for the Type II Pyrethroid Insecticides [J]. *Anal Chim Acta*, 2005, 534(1): 109-120.
- [28] WANG S T, GUI W J, GUO Y R, et al. Preparation of a Multihapten Antigen and Broad Specificity Polyclonal Antibodies for a Multiple Pesticide Immunoassay [J]. *Anal Chim Acta*, 2007, 587(1): 287-292.
- [29] SUN L B, DIANA S, ANATOLY D, et al. Immuno-arrays for Multianalyte Analysis of Chlortriazines [J]. *Talanta*, 2005, 65(2): 331-336.
- [30] SYKES M J, SORICH M J, MINERS J O. Molecular Modeling Approaches for the Prediction of the Nonspecific Binding of Drugs to Hepatic Mitochondria [J]. *J Chem Inf Model*, 2006, 46(9): 2661-2673.
- [31] JULICHER P. Broadening the Antibody Specificity by Hapten Design for an Enzyme-linked Immunoassay as an Improved Screening Method for the Determination of Nitroaromatic Residues in Soils [J]. *Anal Chim Acta*, 1995, 315(3): 279-287.
- [32] SPINKS C A, WYATT G M, LEE H A, et al. Molecular Modeling of Hapten Structure and Relevance to Broad Specificity Immunoassay of Sulphonamide Antibiotics [J]. *Biocon Chem*, 1999, 10(3): 583-588.
- [33] MULDOON M T, HOLTZAPPLE C K, DESHPANDE S S, et al. Development of a Monoclonal Antibody-based ELISA for the Analysis of Sulfadimethoxine. I. Development and Characterisation of Monoclonal Antibodies and Molecular Modeling Studies of Antibody Recognition [J]. *J Agric Food Chem*, 2000, 48(2): 537-544.

(Ed. JIN S H)