

评述与进展

DOI: 10.3724/SP.J.1096.2010.01211

半抗原的设计、修饰及人工抗原的制备

宋娟 王榕妹 王悦秋 唐雨榕 邓安平*

(四川大学化学学院, 成都 610064)

摘要 制备具有良好免疫原性的人工抗原是建立测定小分子化合物的免疫分析方法的最关键步骤。本文对半抗原的设计、修饰(修饰位点的选择、修饰物的制备、连接臂的选择)、载体的选择、半抗原与载体的偶联(偶联方式、偶联条件、最佳偶联率)、人工抗原的纯化与鉴定等方面作了详细的介绍。

关键词 半抗原; 人工抗原; 设计; 修饰; 免疫分析; 评述

1 引言

免疫分析是以抗原与抗体之间特异性识别和可逆性结合反应为基础的痕量分析方法,已在临床分析和生物分析中得到广泛应用。免疫分析不仅适用于大分子化合物(如蛋白质、核酸、细菌)的检测,也适用于小分子化合物(如激素、药物)的测定。由于免疫分析具有特异性强、灵敏度高、简单、快速、费用低和适于现场大批量样品筛选等优点,它在环境和食品安全等分析领域中的应用备受关注^[1]。近年来,针对环境和食品样品中的农药^[2]、兽药^[3-4]、环境激素^[5]、毒素^[6]及违禁食品添加剂^[7]等小分子化合物残留量的免疫分析方法的应用实例较多。建立小分子化合物的免疫分析方法的关键是能够制备出对小分子化合物具有高亲和力和高选择性的抗体。由于大多数农药、兽药等为小分子化合物(分子量小于 1000),不具有免疫原性,即缺乏 T 细胞表位而无法直接诱导动物机体等产生特异性抗体,故小分子化合物被称为半抗原。然而,半抗原可以通过适当的化学修饰方法,在其分子结构的某个位置上,带上端基为活性基团的连接臂,再与大分子载体结合,生成半抗原-载体的偶联物,此偶联物即为人工抗原,它可以借助 T 细胞表位来间接诱导 B 细胞的增殖及分化,产生特异性抗体^[8]。因此半抗原的设计(即如何选择半抗原的修饰位点)、半抗原的修饰(即如何合成端基为功能基团且具有一定长度的连接臂)和人工抗原的制备(即将半抗原修饰物与载体偶联)是制备抗小分子化合物抗体,建立相应的免疫分析方法的重要过程。本文就半抗原的修饰位点及修饰方法,连接臂的长度及功能基团,载体蛋白的选择,半抗原修饰物与载体的偶联方式、条件、最佳偶联比,人工抗原的纯化与鉴定等方面进行综述。

2 半抗原的设计与修饰

2.1 半抗原的设计

要制备抗小分子化合物的抗体,首先对半抗原自身的分子结构有一定的要求,即应有一定的复杂性或刚性,如含有苯环、杂环基团或含有分支结构等,否则难以产生抗体或产生的抗体效价较低。有研究表明,如果半抗原分子具有苯环则制备抗体的成功率为 1/3,而不含苯环的成功率为 1/11^[9]。

在半抗原自身的分子结构基本满足抗体制备的前提下,若半抗原分子具有活性基团,如 $-\text{COOH}$ ^[10], $-\text{NH}_2$ ^[11], $-\text{OH}$ ^[4]等,则半抗原可直接与载体进行偶合,制备人工抗原;对于半抗原没有可直接与载体共价连接的基团,或虽有活性基团但这些基团对维系半抗原的免疫特性和特征结构十分重要,或直接与载体连接后半抗原的特征结构易受载体的局部微化学环境或空间位阻的干扰,影响机

2009-10-26 收稿; 2010-01-03 接受

本文系国家自然科学基金(No. 20675054)资助项目

* E-mail: denganping6119@yahoo.com.cn

体免疫系统的识别等情况,则必须对半抗原重新设计,合成半抗原的修饰物。

半抗原设计的基本要求是尽量保持半抗原的原有分子特征结构以便能暴露在人工抗原的表面,使其能最大限度地被动物的免疫活性细胞所识别,从而刺激机体产生特异性免疫应答,产生对待测物具有高亲和力和高特异性的抗体。因此,半抗原设计的关键是确定半抗原分子结构中适当的修饰位点以及在修饰位点用化学方法连接上具有一定碳链长度的且端基为活性基团的连接臂。

Goodrow 等^[12]对半抗原设计的要求作了更为清晰的叙述,他们认为一个理想的半抗原修饰物应具有:(1)在分子结构、立体化学、电子分布和疏水性上应与待测物分子尽可能相似,以便于机体对特征结构进行识别;(2)半抗原与载体之间的连接臂具有一定长度的碳链,且连接臂应不易诱导机体产生“臂抗体”;(3)修饰后的半抗原分子末端需有可直接与载体蛋白质偶联的活性基团,且活性基团的存在对待测物分子的电子分布应没有影响;(4)半抗原与载体偶联后仍应保留待测物分子的基本结构。

2.2 半抗原的修饰

2.2.1 半抗原分子结构中修饰位点的选择 通常,半抗原分子中有多个可供选择的修饰位点。但是许多研究表明,不同的修饰位点所形成的半抗原修饰物的空间结构不同,即与载体结合后生成的人工抗原表面上所暴露出的抗原决定簇不同,导致产生的抗体在效价、亲和力和特异性上都存在差异^[13]。另外,若修饰位点与半抗原分子的特征结构(如 $-\text{COOH}$, $-\text{NH}_2$, $-\text{OH}$,苯环或杂环等)距离较近,则不利于半抗原分子特征结构的暴露,使得动物的免疫系统对半抗原分子特征结构的识别难度加大,抗体的亲和性和特异性降低。Zhang 等^[14]在制备倍硫磷的人工抗原时,从倍硫磷分子上 5 个不同位置各自引出连接臂,设计并合成了 5 种形式的半抗原修饰物,分别着重暴露硫代磷酸酐结构(X)和芳香环结构(Y)两部分(图 1a),结果发现,当半抗原修饰物的结构与原有半抗原的结构相似性越大,抗体的特异性越大。在合成吡虫啉半抗原时,3 巯基丙酸在碱性条件下于吡虫啉分子吡啶环 4 位 $-\text{Cl}$ 进行亲和取代^[15,16]、在杂环上仲胺直接引入连接臂^[17]、将 $-\text{NO}_2$ 还原为 $-\text{NH}_2$ 而引入连接臂,都能成功合成半抗原修饰物(图 1b)。结果表明,3 种半抗原所产生的抗体有很大的差别,从 $-\text{Cl}$ 部位引入连接臂合成的半抗原所产生的抗体特异性最强,灵敏度也较高。因此,要制备高特异性的抗体,半抗原分子中的修饰位点应远离半抗原的特征结构部分和官能团,使半抗原的特征分子结构部分得以充分暴露,同时避免载体蛋白对半抗原分子特征结构的屏蔽作用。另外,在半抗原分子的不同修饰位点进行化学修饰时,可能会导致半抗原分子中电子分布的改变,从而使半抗原分子的电学性质发生改变,导致人工抗原免疫活性的改变。如 Kusharyoto 等^[18]利用莠去津(Atrazine)合成抗原时,分别将 $-\text{Cl}$ 基团和 $-\text{C}$ 端作为修饰位点,结果发现,将修饰位点选择从 $-\text{Cl}$ 端进行制备的半抗原修饰物不影响莠去津分子中的电子分布,可以产生效价较高的抗体,而选择 $-\text{C}$ 端作为修饰位点则莠去津分子中的电子分布会发生较大改变,从而得到的抗体效价会降低很多(图 1c)。Newsome 等^[19]选择 3 种不同的修饰位点合成灭草隆半抗原时发现,从 S1 端制备的人工抗原比从 S3 端制备的人工抗原更好地保留了原有分子中苯环的电子分布,生成的抗体特异性更强(图 1d)。

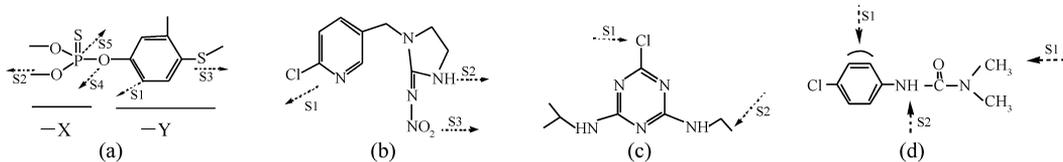


图 1 倍硫磷(a)、吡虫啉(b)、莠去津(c)和灭草隆(d)半抗原的修饰物

Fig 1 Chemical modification of fenthion (a), imidacloprid (b), atrazine (c) and monuron (d)

以上结果表明,从半抗原分子中不同的修饰位点所形成的半抗原修饰物与载体蛋白所合成的人工抗原的免疫性存在差异,可产生不同免疫亲和性和特异性的抗体。如果一个半抗原分子有多个不同的修饰位点时,应尽可能利用不同的修饰位点合成出几种半抗原修饰物,选择半抗原分子结构保持最完整的修饰物与载体相连制备人工抗原,此种人工抗原预期可以得到亲和力高、特异性强的抗体;同时可以选择半抗原分子结构保持得不够完整的修饰物与载体相连制备包被抗原。当用于制备包被抗原的半抗原修饰物的分子结构与原有半抗原的结构差异性越大,抗体与包被抗原的亲和力越弱,越有可能建立

起具有高灵敏度的测定小分子化合物的间接竞争免疫分析方法。

2.2.2 半抗原修饰物的制备 对所设计的目标半抗原修饰物,其制备方式包括对待测物进行结构修饰,或利用相关的中间体、代谢产物、原料重新合成。(1)利用待测物现有结构或中间体,通过氧化(如双键氧化为羧酸)、还原(如 $-\text{NO}_2$ 还原为 $-\text{NH}_2$)、取代(如 $-\text{C}$ 可用 $\text{HS}(\text{CH}_2)_n\text{COOH}$ 与其发生亲核取代反应)、水解(如 $-\text{CN}$ 可通过水解引入 $-\text{COOH}$)等反应产生相应的功能基团;(2)利用其代谢产物。在对硫磷半抗原的合成中,以对硫磷的自然降解产物中的一类主要产物——对氨基对硫磷作为半抗原,采用人工方法将对硫磷降解为氨基对硫磷,将硝基转化为氨基^[20]。Jung等^[21]分别选用禾草灵和菊酯的代谢产物中含羧基基团的产物,成功合成人工抗原。另外,也可用结构类似物作先导物,对其进行改造,得到需要的半抗原,如 Miyamoto等^[22]在吡螨灵半抗原的合成中,用吡螨灵的结构类似物半琥珀酸胆固醇为先导物合成含有活性基团的半抗原;(3)利用原料、试剂重新合成,在适当的位置引入带有功能基团的小分子。如余万俊^[23]利用对硝基苯乙氰为起始原料,通过 5 步反应合成了带有氨基的杀虫脒的衍生物。Gui等^[24]在制备三唑磷的半抗原时以三氯硫磷、苯唑醇、巯基丙酸为原料,采用 3 步反应,先合成 *o*-乙基硫代磷酰氯(TZM1),再合成 *o*-乙基-*o*-(1-苯基-1,2,4-三唑-3-基)硫代磷酰氯(TZM2),最后得到带有羧基的三唑磷衍生物(图 2a);在磁力搅拌的冷水浴条件下,连有羧基的苏丹红 1 号可由对氨基苯乙酸与 2-萘酚在无机酸、碱、盐水溶液中合成(图 2b)^[17]。重新合成通常要通过多步反应才能实现,因此与以上两种方法相比,此种方法难度最大。但是这种方法的优点是易于确立最佳的偶联位点,也易于构建合理的间隔臂,使产生针对特征结构的抗体的可能性增大,因此是很有发展潜力的半抗原合成方法。

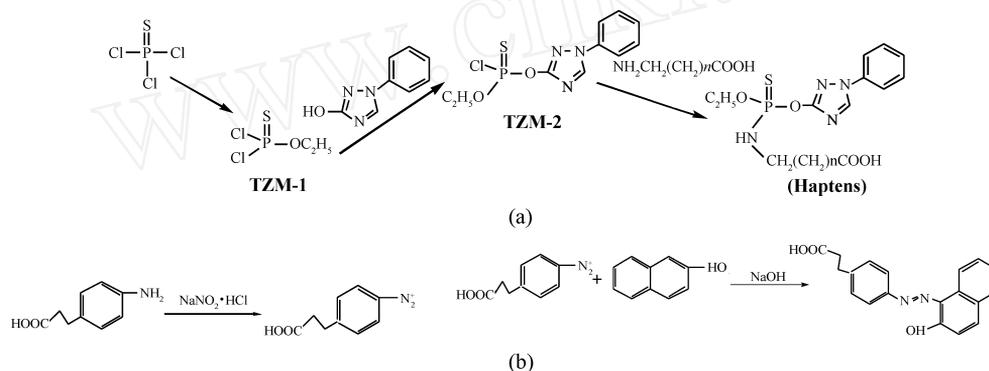


图 2 三唑磷半抗原 (a)和苏丹红 1号半抗原 (b)的合成

Fig 2 Synthesis of hapten triazophos(a) and hapten Sudan I (b)

半抗原修饰物合成后,应通过相应的检测技术(UV, IR, NMR, MS等)来确证所合成的化合物是否为所设计的目标化合物。

2.2.3 半抗原修饰物中连接臂的选择 半抗原特征分子结构与载体之间的连接部分为连接臂。引入连接臂的目的主要是为了在人工抗原表面突显出半抗原的特征结构(一般是重要的抗原决定簇),以利于产生具有高特异性的抗体。

连接臂的选择应该遵循以下基本原则:(1)连接臂的连接应尽量避免在目标半抗原的官能团处或靠近官能团处,最好位于重要的特征性官能团的远端,避免减少抗体与目标半抗原的识别。结构类似的一类化合物,连接臂应当在它们具有相同结构(或类似结构)的位置连接,以最大限度的使分子的特征部位暴露;(2)连接臂长度要适宜。连接臂太短,则载体的空间位阻影响动物的免疫系统对半抗原特征结构的识别,且半抗原的立体结构容易受到载体局部化学环境的影响而发生变化;连接臂太长,则可能因氢键(某些极性连接臂)、疏水作用(非极性连接臂)或其它作用力使半抗原发生“折叠”。Fricia^[25]认为 3~6 个碳原子直链是最佳的长度。但是这种观点尚且需要进一步证实。如 Johnson等^[26]使用了 4 个碳原子的连接臂;薛小平等^[27]只用了 1 个碳原子作连接臂,他们都合成了有机磷类农药簇半抗原,但得到抗体的效价相差却不明显。此外, Kim等^[13]研究发现,抗体的效价因连接臂长度的不同变化较小,而当连接臂的结构发生变化时,抗体的效价会发生很大的变化。而对于不同的半抗原,连接臂的最

佳长度也可能不同；(3)避免连接臂中含较强的决定簇(如芳环、共轭双键或杂环等),通常以含末端活性基团的链环烃为宜,以减少所产生的抗体对连接臂的过度识别而降低对目标分子的识别能力。

3 载体的选择和半抗原修饰物与载体的偶联

3.1 载体的选择

在半抗原载体偶联物即人工抗原中,载体不仅可增加半抗原的相对分子质量,或仅起到运载作用,而且可依靠本身的结构特异性和免疫原性,诱导机体产生免疫应答反应,继而诱导对半抗原分子的识别,这种现象称为载体效应^[28]。常见载体一般为蛋白质,如球蛋白片段(Globulin fractions)、牛血清白蛋白(Bovine serum albumin, BSA)、鸡卵清蛋白(Ovalbumin, OVA)、钥孔血蓝蛋白(Keyhole limpet hemocyanin, KLH)、兔血清白蛋白(Rabbit serum albumin, RSA)、人血清白蛋白(Human serum albumin, HSA)、甲状腺球蛋白(Thyroglobulin)、纤维蛋白原(Fibrinogen)或兔和鸡的丙种球蛋白等。其中,最常用的载体是牛血清白蛋白(BSA)。BSA物化性质稳定、不易变性、价廉易得,且赖氨酸含量高,分子内有很多自由的氨基,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-二甲基甲酰胺等)的情况下都能与半抗原修饰物进行偶联。钥孔血蓝蛋白(KLH)因其与脊椎动物免疫系统具有很好的异源性而被认为是优先选择的载体,但KLH价格昂贵。近年来,也有报道用人工合成多聚肽(常用多聚赖氨酸PLL)为载体,其优点是可增加半抗原的免疫原性。

3.2 半抗原修饰物与载体的偶联

半抗原修饰物与载体偶联的常用方法有化学偶联法(Chemical conjunction)、化学生物学方法(Chemical-biological methods)和免疫学标记法(Immunological labeling methods)。其中以化学偶联法最常用,它是利用化学试剂(偶联剂或交联剂)在一定条件下将两种物质连接起来(一步法或直接法)。

3.2.1 半抗原修饰物与蛋白质的偶联方式 一般可根据半抗原修饰物所含活性基团的不同,选择不同的方式与载体蛋白进行偶联。如半抗原修饰物含羧基,则可通过碳化二亚胺法、混合酸酐法、活性酯法与载体蛋白进行偶联;半抗原修饰物含氨基,则可通过戊二醛法、二异氰酸酯法、卤代硝基苯法、亚胺酸酯法、碳酰氯法(光气法)、重氮化法等与载体蛋白进行偶联;半抗原修饰物含羟基,则可通过琥珀酸酐法、偶氮苯甲酸法、一氯醋酸钠法等与载体蛋白进行偶联;若半抗原修饰物含巯基,可通过SAMSA(S-乙酰基巯基琥珀酸酐)反应与载体蛋白质通过二硫键交联;若半抗原修饰物含醛基或酮基,可通过O-(羧甲基)羟胺法和对胂基苯甲酸法合成带有羧基的中间体,再通过羧基与蛋白质的氨基结合。常见的半抗原衍生物和蛋白质的偶联方法列于表1^[29]。

表 1 常见的半抗原修饰物和载体蛋白的偶联方法

Table 1 Common methods of hapten-derivative coupling with carrier protein

| 偶联方法 Coupling methods | 活性基团 Active groups | 反应原理 Reaction principle | 应用实例 Applied examples |
|------------------------------------|-----------------------|---|--------------------------|
| 碳化二亚胺法 Carbodiimide method | COOH | $\text{RCOOH} + \text{R}'\text{-N}=\text{C}=\text{N}-\text{R} \longrightarrow \text{R}'\text{-NH}-\underset{\text{OCOR}}{\text{C}}=\text{N}-\text{R} \xrightarrow{\text{H}_2\text{N}-\text{G}} \text{RCONH}-\text{G} +$ | [30] |
| 活性酯法 Active ester method | COOH | | [24, 31] |
| 混合酸酐法 Mixed anhydride method | COOH | $\text{RCOOH} + \text{ClCOCH}_2\text{CH}(\text{CH}_3)_2 \xrightarrow{(\text{n-C}_4\text{H}_9)_3\text{N}} \text{RCOOCOCH}_2\text{CH}(\text{CH}_3)_2 \xrightarrow{\text{OH}-\text{C}_6\text{H}_4-\text{G}} \text{RCONH}-\text{G}$ | [32 ~ 34] |
| 偶氮苯甲酸法 Azo-benzonic acid method | COOH | | [7] |

续表 1 (Continued to Table 1)

| 偶联方法 Coupling methods | 活性基团 Active groups | 反应原理 Reaction principle | 应用实例 Applied examples |
|---|-----------------------|---|--------------------------|
| 重氮化法 Diazotization method | NH ₂ | $\text{R}-\text{C}_6\text{H}_4-\text{NH}_2 + \text{NaNO}_2 \longrightarrow \text{R}-\text{C}_6\text{H}_4-\text{N}_2^+\text{Cl}^- \xrightarrow{\text{HO}-\text{C}_6\text{H}_4-\text{OH}} \text{R}-\text{C}_6\text{H}_4-\text{N}=\text{N}-\text{C}_6\text{H}_3(\text{OH})_2$ | [5] |
| 戊二醛法 Glutaraldehyde method | NH ₂ | $\text{R}-\text{NH}_2 + \text{HC}(\text{O})\text{CH}_2\text{CH}_2\text{CH}_2\text{CHO} + \text{H}_2\text{N}-\text{C} \longrightarrow \text{RN}=\text{CH}(\text{CH}_2)_3\text{CH}=\text{N}-\text{C}$ | [35, 36] |
| 氰脲酰氯法 Cyanogen chloride method | OH | $\text{R}-\text{OH} + \text{Cl}-\text{C}_6\text{H}_3(\text{Cl})_2-\text{N}_3 \longrightarrow \text{R}-\text{O}-\text{C}_6\text{H}_3(\text{Cl})_2-\text{N}_3 \xrightarrow{\text{H}_2\text{N}-\text{C}} \text{R}-\text{O}-\text{C}_6\text{H}_3(\text{Cl})_2-\text{NH}-\text{C}$ | [37] |
| <i>N, N</i> 羰基二咪唑法 <i>N, N</i> -Carbonyldiimidazole method | OH | $\text{ROH} \xrightarrow[\text{DMAP}]{\text{CDI}} \text{R}-\text{O}-\text{C}(=\text{O})-\text{N}(\text{Im})_2 \xrightarrow{\text{H}_2\text{N}-\text{C}} \text{R}-\text{O}-\text{C}(=\text{O})-\text{NH}-\text{C}$ | [4, 38] |
| 叠氮化法 Azide method | COOCH ₃ | $\text{RCOOCH}_3 \longrightarrow \text{RCONHNH}_2 \longrightarrow \text{R}-\text{CON}_3 \xrightarrow{\text{H}_2\text{N}-\text{C}} \text{RCONH}-\text{C}$ | [39] |
| <i>O</i> 羧甲基羟胺法 <i>O</i> -Carboxymethyl hydroxylamine method | C=O | $\begin{aligned} \text{R}'-\text{C}(=\text{O})-\text{R} + \text{H}_2\text{NOCH}_2\text{COOH} &\longrightarrow \text{R}'-\text{C}(=\text{NOCH}_2\text{COOH})-\text{R} \xrightarrow{\text{H}_2\text{N}-\text{C}} \text{R}'-\text{C}(=\text{NOCH}_2\text{CONH}-\text{C})-\text{R} \\ \text{R}'-\text{C}(=\text{O})-\text{R} + \text{H}_2\text{NHN}-\text{C}_6\text{H}_4-\text{COOH} &\longrightarrow \text{R}'-\text{C}(=\text{NNH}-\text{C}_6\text{H}_4-\text{COOH})-\text{R} \xrightarrow{\text{H}_2\text{N}-\text{C}} \text{R}'-\text{C}(=\text{NNH}-\text{C}_6\text{H}_4-\text{CONH}-\text{C})-\text{R} \end{aligned}$ | [40, 41] |
| 对 胍基苯甲酸法 4-Hydrazinobenzoic acid method | C=O | $\text{R}'-\text{C}(=\text{O})-\text{R} + \text{H}_2\text{NHN}-\text{C}_6\text{H}_4-\text{COOH} \xrightarrow{\text{H}_2\text{N}-\text{C}} \text{R}'-\text{C}(=\text{NNH}-\text{C}_6\text{H}_4-\text{CONH}-\text{C})-\text{R}$ | [42, 43] |

3.2.2 半抗原修饰物与载体蛋白的偶联条件

半抗原修饰物与载体蛋白进行偶联的条件主要包括：(1)半抗原载体物、载体蛋白和偶联剂在偶联反应中的相对浓度及其初始的摩尔比；(2)用于溶解半抗原修饰物、载体蛋白和偶联剂的缓冲液成分、pH(一般 pH = 6.0 ~ 8.0)及其离子强度；(3)若半抗原修饰物和偶联剂都能在水中溶解,偶联反应可在水相中进行;若半抗原修饰在水中溶解度不大或者不能溶解(如类固醇激素及其它脂溶性物质),则偶联反应应在有机相中进行,此时应选择既能使半抗原修饰物溶解又保持载体蛋白呈可溶状态,并对载体蛋白的生物活性没有影响的有机溶剂(如吡啶、二氧六环、丙酮、二甲基甲酰胺等);(4)偶联反应的温度和时间应当适度控制;最后,在某些特殊偶联反应中对半抗原修饰物或载体蛋白质采取特殊的保护措施等。

3.2.3 偶联率

人工抗原中半抗原与载体蛋白的摩尔分子比称为偶联率。除半抗原结构特征外,偶联率也是影响人工抗原免疫效果的重要因素。适宜的偶联率有助于提高抗体的亲和力和选择性。Witmann等^[44]发现莠去津半抗原与载体蛋白的偶联率为 35:1 时,产生最佳抗血清。Wust等^[45]则用偶联率大于 700 的阿特拉津(Atrazine)人工抗原对绵羊进行免疫,也得到了特异性的抗体。而 Schneider等^[46]认为最佳偶联比为 10~20。对于偶联率,过去曾经认为较大为好,但实验表明,过多的半抗原并不能得到预期的效果。因为载体上覆盖过多的半抗原时,可能不利于载体与淋巴细胞的结合,不能使载体引起免疫反应。但也有些实验结果表明^[47],偶联率对诱导抗体的产生并无决定性的影响,偶联比为 1 时也可产生特异性抗体,低偶联率的人工抗原引起的免疫反应较慢,但可获得高亲和力的抗体。为取得比较理想的免疫效果,应根据具体情况选择适宜的偶联率。

4 人工抗原的纯化与鉴定

半抗原修饰物与载体偶联后所得的人工抗原必须进行纯化,以除去未反应的半抗原小分子、盐类及其它小分子杂质。最常用的方法是透析和凝胶层析。透析一般所需时间较长(通常需 2d 以上),纯化较为彻底、操作相对简单。而凝胶层析所需时间较短,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。

对纯化后人工抗原进行鉴定,一方面定性判断半抗原与载体是否偶联成功;另一方面是定量测定偶联率和蛋白质含量。判断是否偶联成功最常用的为紫外扫描法,如果人工抗原的紫外吸收特征兼具有或不同于原半抗原和载体蛋白的紫外吸收特征,则可初步判断偶联成功。偶联率的测定主要有紫外分光光度法^[7]、标记抗原示踪法^[48]、SDS-PAGE法^[49]、ESIMS法^[50]、MALDI-TOF-MS法^[51~53]等。对于有机磷类农药,可以用测定磷的浓度和蛋白质浓度之比的方法来测定,如甲基对氧磷结合比的测定;也可采用计算偶联反应前后蛋白质中游离 $-NH_2$ 的数量差异来测定,如二硝基酚法;或者根据反应前后氨基酸的含量变化来推算;另外还有元素分析法、红外光谱法等。

5 展 望

为建立食品和环境分析领域中测定小分子化合物的免疫分析方法,在半抗原的设计、修饰及人工抗原的制备等方面进行了大量的科研工作,已有一些规律可循,但目前仍存在两个主要问题:(1)半抗原分子设计理论不够完善,人们对半抗原结构与免疫效果之间内在关系的认识还比较缺乏,半抗原的设计与合成仍然带有一定的盲目性;(2)半抗原的设计和修饰面临新的挑战,单一有害物质残留的检测方法已逐渐不能适应现代检测的需求,多组分检测方法和一类化合物总量检测方法将逐渐代替传统的单一组分残留检测方法。近年来,通过计算机对结构类似的化合物的 3D 分子模拟^[54,55],可得到各个化合物的详细信息(如分子结构、空间位阻、电子分布等),指导人们更加科学地进行半抗原的设计和修饰,由此制备的抗体可对这一类物质有较大的交叉反应率,从而建立灵敏的多组分分析方法。另外,随着生物学技术和有机合成技术的发展,除了可以依赖于动物或细胞筛选制备抗小分子的多克隆和单克隆抗体之外,近年来,分子印迹^[56,57]、核酸适配体^[58~60]和噬菌体展示肽库^[61,62]等技术和方法也蓬勃发展起来,目的是通过人工合成或直接筛选方法制备出与抗体功能类似的能与小分子化合物具有特异性识别的聚合物、配体或多肽,用于小分子化合物的分析及测定^[63]。尽管有关分子印迹、适配体和噬菌体展示肽库的研究方兴未艾,但迄今为止,由上述技术所制备出的分子印迹聚合物、配体或多肽,在亲和力和特异性识别方面还无法与抗体相媲美。

References

- 1 CHEN Fu-Sheng(陈福生), GAO Zhi-Xian(高志贤), WANG Jian-Hua(王建华). *Food Safety Monitoring and Modern Biotechnology*(食品安全检测与现代化生物技术). Beijing(北京): Chemical Industry Press(化学工业出版社), 2004: 10
- 2 Shu TW, Wen J G, Yi R G, Guo N Z. *Anal Chim. Acta*, 2007, 587(1): 287~292
- 3 Xing W W, He L, Yang H, Sun C J, Li D W, Yang X M, Li Y, Deng A P. *J. Sci. Food Agri*, 2009, 89(13): 2165~2173
- 4 Zhao D, He L, Pu C, Deng A P. *Anal Bioanaly. Chem.*, 2008, 391(7): 2653~2661
- 5 Pu C, Wu Y F, Yang H, Deng A P. *Anal Chim. Acta*, 2008, 628(1): 73~79
- 6 Shim W B, Kim J S, Kim J Y, Choi J G, Je J H, Kuzmina N S, Erer in S A, Chung D H. *Food Sci Biotechnol* 2008, 17(3): 623~630
- 7 Han D, Yu M, Knopp D, Niessner R, Wu M, Deng A P. *J. Agric. Food Chem.*, 2007, 55(16): 6424~6430
- 8 JIAO Kui(焦奎), ZHANG Shu-Sheng(张书圣). *The Technology and Application of Enzyme-Linked Immunoassay*(酶联免疫分析技术及应用). Beijing(北京): Chemical Industry Press(化学工业出版社), 2004: 2
- 9 Szurdoki F, Bekheit H K M, Marco M P. *J. Agric. Food Chem.*, 1992, 40(8): 1459~1465
- 10 Ji L. *Food and Agricultural Immunology*, 2009, 20(1): 35~47
- 11 Weller M G, Diemer M, Wersching C, Niessner R, Sochor H. *J. Agric. Food Chem.*, 2003, 51(23): 6668~6675
- 12 Goodrow M H, Hammock B D. *Anal Chim. Acta*, 1998, 376(1): 83~91
- 13 Kim Y J, Cho Y A, Lee H S. *Anal Chim. Acta*, 2003, 494(1-2): 29~40
- 14 Zhang Q, Liu F Q. *Anal Chim. Acta*, 2007, 596(2): 303~311
- 15 Li K, Qing X L. *J. Agric. Food Chem.*, 2000, 48(8): 3378~3382

- 16 ZHU Guo-Nian (朱国念), GUI Wen-Jun (桂文君). *China Agricultural Science* (中国农业科学), **2005**, 38 (3): 511 ~ 515
- 17 Lee J K, Ahn K C, Park O S, Kang S Y, Hammock B D. *J Agric Food Chem.*, **2001**, 49 (5): 2159 ~ 2167
- 18 Kusharyoto W, Pleiss J, Bachmann T T, Schmid R D. *Protein Engineering*, **2002**, 15 (3): 233 ~ 241
- 19 Newsome W H, Collins P G. *Food Agric Immunol*, **1990**, 2: 75
- 20 ZHANG Chun-Zheng (张存政), LIU Xian-Jin (刘贤进), YU Xiang-Yang (余向阳). *J. Nanjing Agricultural University* (南京农业大学学报), **2002**, 25 (4): 37 ~ 40
- 21 Jung F, Meyer H, Hamm R. *J. Agric Food Chem.*, **1989**, 37 (4): 1183 ~ 1187
- 22 Miyamoto T, Kuwahara T, Yamamoto I. *Pesticide Biochemistry and Physiology*, **2001**, 69: 174 ~ 182
- 23 YU Wan-Jun (余万俊). *Chinese Journal of Health Inspection* (中国卫生检验杂志), **1995**, 5: 131 ~ 134
- 24 Gui W J, Jin R Y, Chen Z L, Cheng J L, Zhu G N. *Anal Biochem.*, **2006**, 357: 9 ~ 14
- 25 Frieia J. *Pestic Sci*, **1989**, 26: 303 ~ 307
- 26 Johnson J C, Van Emon J M, Pullman D R, Keeper K R. *J. Agric Food Chem.*, **1998**, 46 (8): 3116 ~ 3123
- 27 XUE Xiao-Ping (薛小平), ZHANG Mei-Shun (张美顺). *Chinese Journal of Biological Engineering* (中国生物工程杂志), **2003**, 23 (6): 68 ~ 75
- 28 Harrison R O, Goodrow M H, Hammock B D. *J. Agric Food Chem.*, **1991**, 39 (1): 122 ~ 128
- 29 HONG Xiao-Zhuang (洪孝庄), SUN Man-Wen (孙曼雯). *Protein linking Technology* (蛋白质连接技术). China Medical Science and Technology Press (中国医药科技出版社), **1993**: 2 ~ 10
- 30 Liu Y, Lou Y, Xu D, Xu D, Qian G L, Zhang Q, Wu R R, Hu B S, Liu F Q. *Microchemical Journal*, **2009**, 93 (1): 36 ~ 42
- 31 Cheng C C, Hsieh K H, Lei Y C, Tai Y T, Chang T H, Sheu S Y, Li W R, Kuo T F. *J. Agric Food Chem.*, **2009**, 57 (13): 5687 ~ 5692
- 32 XIE Zhong-Liang (谢忠良), LI Wen (李文), HE Ji-Guo (何计国). *Food Science* (食品科学), **2009**, 30 (1): 228 ~ 231
- 33 HE Xiao-Wei (何小维), LIU Xiao-Yun (刘晓云). *South China University of Technology* (华南理工大学学报), **2007**, 35 (11): 125 ~ 128
- 34 YANG Ting-Ting (杨婷婷), SUN Xiu-Lan (孙秀兰), SHAO Jing-Dong (邵景东), WANG Hong-Xin (王洪新). *J. Cellular and Molecular Immunology* (细胞与分子免疫学杂志), **2008**, 24 (9): 924 ~ 927
- 35 Srtasser A, U sleber E. *Food and Agricultural Immunology*, **2003**, 152: 135 ~ 143
- 36 WU Yang (吴扬), YUAN Jun-Lin (袁均林). *Environmental Science and Technology* (环境科学与技术), **2007**, 30 (4): 40 ~ 42
- 37 ZHANG Jin-Hui (张津辉), JIANG Zhong-Hua (蒋中华). *Biomolecular Immobilization Technology and Applications* (生物分子固定化技术及应用). Beijing (北京): Chemical Industry Press (化学工业出版社), **1998**: 57 ~ 60
- 38 WU Yuan-Yuan (吴媛媛), BAO Yong-Ming (包永明). *Chemical Bulletin* (化学通报), **2005**, 6: 458 ~ 463
- 39 Johnson J R. *Br J. Cancer*, **1981**, 44: 472
- 40 Khripach V A, Litvinovskaya R P. *Vestsi Natsyonal'nai Akademii Navuk Belarusi, Seryya Khimichnykh Navuk*, **2008**, 3: 47 ~ 58
- 41 Xu C H, Xiang Z X. *Electrophoresis*, **2008**, 29 (16): 3406 ~ 3413
- 42 Zhao W H, Liu X R, Yue N. *Hecheng Huaxu*, **2008**, 16 (3): 310 ~ 312
- 43 Galindev O, Badraa N, Shim Y K. *J. Porphyrins and Phthalocyanines*, **2007**, 11: 829 ~ 835
- 44 Wittmann C, Hock B. *J. Food Agric Immunol*, **1989**, 1 (4): 211 ~ 224
- 45 Wust S, Hoek B. *Anal Lett*, **1992**, 25: 1025 ~ 1037
- 46 Schneider P, Hammock B D. *J. Agric Food Chem.*, **1992**, 40 (3): 525 ~ 530
- 47 Parker C W. *Biologically Active Compounds Radioimmunoassay* (生物活性化合物的放射免疫测定法). Beijing (北京): Science Press (科学出版社), **1981**: 165
- 48 Feng P C, Horton S R, Sharp C R. *J. Agric Food Chem.*, **1992**, 40 (2): 211 ~ 216
- 49 Kamps-Holtzapfel C, Carlin R J, Sheffield C. *Immunological Methods*, **1993**, 164: 245 ~ 253
- 50 Straub K M, Levy M J. *Bioconj Chem.*, **1994**, 5 (3): 194 ~ 198
- 51 Zhang Y F, Gao Z X, Sun H W. *Chemical Research In Chinese Universities*, **2008**, 24 (6): 697 ~ 700

- 52 Fox M, Gray G, Kavanagh K, Lewis C, Doyle S *Microbiological Methods*, **2004**, 56(2): 221 ~ 230
- 53 Singh K V, Kaur J, Raje M, Varshney G C, Suri C R *Bioconjugate Chem.*, **2004**, 15(1): 168 ~ 173
- 54 Wang Z H, Zhu Y, Ding S Y, He F Y, Li J C, Jiang H Y, Shen J Z *Anal Chem.*, **2007**, 79(12): 4471 ~ 4483
- 55 Cao L M, Kong D X, Sui J X, Jiang T, Li Z Y, Ma L, Lin H *Anal Chem.*, **2009**, 81(9): 3246 ~ 3251
- 56 Li Y H, Yang T, Qi X L, Qiao Y W, Deng A P. *Anal Chim. Acta*, **2008**, 624(2): 317 ~ 325
- 57 Yang T, Li Y H, Wei S, Li Y, Deng A P. *Analytical and Bioanalytical Chemistry*, **2008**, 391(8): 2905 ~ 2914
- 58 Lee H J, Kim B C, Kim K W, Kim Y K, Kim J, Oh M K *Biosensors & Bioelectronics*, **2009**, 24(12): 3550 ~ 3555
- 59 Wang J L, Ahsan M, Zhou H S *Talanta*, **2009**, 79(1): 72 ~ 76
- 60 Ngundi M M, Kulagina N V, Anderson G P, Taitt C R. *Expert Review of Proteomics*, **2006**, 3(5): 511 ~ 524
- 61 Beninati C, Garibaldi M, Lo Passo C, Mancuso A G, Papasergia S, Garufib G, Pemiceb I, Tetia G, Felicic F. *Peptides*, **2009**, 30(10): 1936 ~ 1939
- 62 Inaba J, Nakamura S, Shimizu K, Asania T, Suzuki Y. *Anal Biochem.*, **2009**, 388(1): 63 ~ 70
- 63 Techera A G, Kim H J, Gee S J, Last J A, Hammock B D, González-Sapienza G *Anal Chem.*, **2007**, 79(23): 9191 ~ 9196

Hapten Design, Modification and Preparation of Artificial Antigens

SONG Juan, WANG RongMei, WANG Yue-Qiu, TANG Yu-Rong, DENG An-Ping*

(College of Chemistry, Sichuan University, Chengdu 610064)

Abstract The key step to develop an immunoassay for small molecular compound is to synthesize artificial antigens with good immunogenicity. In this article, the hapten design and modification (e.g. the choice of modified sites, preparation of hapten derivative, choice of linking spacer), selection of carrier, coupling of hapten derivative to carrier (including coupling method, coupling conditions, the best coupling rate), purification and identification of artificial antigens were reviewed.

Keywords Hapten; Artificial antigens; Design; Modification; Immunoassay; Review

(Received 26 October 2009; accepted 3 January 2010)

《近红外光谱法快速分析药品》

该书是介绍利用近红外光谱方法进行假药识别,实现药品无损定性、定量分析,并同时分析活性成分和辅料,提供产品的指纹信息等方面的专著。不仅详细介绍了建立药品通用性近红外模型的基本理论,NIR通用性模型的建模思路与方法,而且对建立液体制剂、粉针剂、口服固体制剂通用性近红外定性、定量模型的一般方法分别进行了论述,还对目前流行的在流通领域快速筛查假劣药品的近红外无模型检测技术进行了介绍。

该书可作为以近红外分析技术从事打击假劣药品工作的药品检验人员的培训教材,对从事药物分析、光谱分析、化学计量学等方面的科研工作者有参考和实用价值;亦可作为大专院校研究生和高年级学生学习光谱分析、药物分析课的参考书。

该书由胡昌勤、冯艳春著,化学工业出版社于2010年1月出版,定价85.00元。