

基于树状分子提高 AMOZ 半抗原免疫原性的研究

刘凤银, 沈玉栋, 肖治理, 杨金易, 孙远明, 王弘, 雷红涛, 徐振林

(华南农业大学食品学院, 广东省食品质量安全重点实验室, 广东广州 510642)

摘要: 3-氨基-5-吗啉甲基-2-恶唑烷酮 (AMOZ) 是抗生素呋喃它酮的代谢产物, 具有潜在致畸、致癌性。由于分子量太小, 其特异性抗体制备尚未突破, 无法建立直接检测的免疫分析方法。为了制备针对 AMOZ 的特异性抗体, 本研究首次尝试采用赖氨酸树状分子(G5)替代传统载体蛋白, 将 AMOZ 的乙醛酸衍生半抗原 AMOZA 直接偶联到 G5 分子上制备免疫原 (AMOZA-G5), 免疫 Balb/c 小鼠, 收集抗血清并进行间接竞争酶联免疫分析 (ciELISA) 测定。结果发现: 传统免疫原 AMOZA-BSA 对应的抗血清无法特异性识别游离 AMOZ, 而 AMOZA-G5 对应的抗血清则可以特异性识别游离 AMOZ, 在 ciELISA 实验中, 1 $\mu\text{g/mL}$ AMOZ 对抗体活性的抑制率为 35%, 说明以赖氨酸树状分子为载体可以有效提高小分子半抗原的免疫原性。本研究对于制备其他小分子半抗原的特异性抗体提供了方法借鉴。

关键词: 树状分子; 半抗原; 抗体; 3-氨基-5-吗啉甲基-2-恶唑烷酮 (AMOZ)

文章编号: 1673-9078(2015)8-31-36

DOI: 10.13982/j.mfst.1673-9078.2015.8.006

Enhancing the Immunogenicity of Hapten 3-Amino-5-morpholinomethyl-2-oxazolidone (AMOZ) Using Dendrimer as a Carrier

LIU Feng-yin, SHEN Yu-dong, XIAO Zhi-li, YANG Jin-yi, SUN Yuan-ming, WANG Hong, LEI Hong-tao, XU Zhen-lin

(South China Agricultural University, Guangdong Provincial Key laboratory of Food Safety and Quality, Guangzhou 510642, China)

Abstract: 3-Amino-5-morpholinomethyl-2-oxazolidone (AMOZ), a metabolite of antibiotic furaltadone, is a potential teratogenic and carcinogenic substance. However, an immunoassay for the direct estimation of AMOZ was so far unavailable due to its low molecular weight and lack of a specific antibody. In this study, polylysine dendrimer (G5) was used for the first time instead of the traditional carrier (bovine serum albumin (BSA)), to conjugate with AMOZ glyoxylate derivative hapten (AMOZA) to generate the immunogen (AMOZA-G5) that would produce AMOZ-specific antibodies. Balb/c mice were immunized, antisera were collected, and examined by competitive indirect enzyme-linked immune sorbent assay (ciELISA). The results revealed that the antiserum from AMOZA-BSA immunization was not specific to free AMOZ, however, that from AMOZA-G5 immunization showed specificity. ciELISA experiment showed an inhibition rate of 35% for 1 $\mu\text{g/mL}$ AMOZ). The results indicated that polylysine dendrimer as a carrier effectively improved the immunogenicity of small-molecule haptens. This study provides a new strategy for the production of specific antibodies against small-molecule haptens.

Key words: dendrimers; hapten; antibody; 3-amino-5-morpholinomethyl-2-oxazolidone

基于抗原-抗体识别的免疫分析技术在小分子化学性污染物检测领域占有重要地位, 已经成功应用于农药、兽药、生物毒素等的快速检测, 为保障食品安全发挥了重要作用。但是, 大量实践证明: 当化合物

收稿日期: 2014-10-26

基金项目: 国家自然科学基金资助项目 (31271865; 31371769); 广东省自然科学基金资助项目 (S2012040008046; S2012010010323); 广东省科技计划支撑项目 (22012A020100002)

作者简介: 刘凤银 (1990-), 女, 研究生, 研究方向: 食品质量安全

通讯作者: 孙远明 (1956-), 男, 博士, 教授, 研究方向: 食品安全与检测技术;

徐振林 (1982-), 男, 博士, 教授, 研究方向: 食品安全与检测技术

(半抗原)的分子量 <300 时, 其特异性的高亲和力抗体制备难度增大^[1], 因此许多针对小分子量有害物的免疫检测至今尚未取得突破。譬如, 抗生素呋喃它酮的代谢产物 3-氨基-5-吗啉甲基-2-恶唑烷酮 (AMOZ), 具有潜在致畸、致癌性, 但是目前制备其特异性抗体尚未突破, 现有的免疫分析法均采用衍生策略进行。Pimpitak 等尝试以 AMOZ 的 3-羧酸苯甲醛衍生物 (CPAMOZ) 作为半抗原与载体蛋白偶联进行免疫得到抗体, 该抗体虽可以识别 AMOZ, 但灵敏度很差, 不能满足实际检测需求, 最终只能通过建立检测 AMOZ 的 2-硝基苯甲醛衍生物 (NPAMOZ) 实现对其间接检

测^[2]。Xu 等通过引入不同的手臂制备了一系列新型 AMOZ 半抗原, 获得的抗体提高了对 NPAMOZ 的检测灵敏度, 但对 AMOZ 的灵敏度却未能提高^[3]。亦有研究者尝试利用单克隆抗体筛选手段, 以期筛选到高质量的单克隆细胞株, 虽取得了一定的进展, 但仍旧由于灵敏度的限制, 需要在样品前处理阶段进行高倍数的富集浓缩, 大大增加了样品前处理难度^[4]。由于衍生化策略步骤繁杂、衍生时间长, 且衍生效率受基质干扰影响, 导致回收率偏低, 限制了其应用。

树状分子作为一类新型的高分子化合物, 具有分子组成明确、结构规整、高度支化以及表面呈现高密度功能团等众多优良特性。在疫苗制备领域, 有研究者研究表明用树状分子作为载体与目标肽偶联, 可以诱导机体产生针对目标肽的高效价、高亲和力和高特异性的抗体; 亦可同时偶联两种或多种不同的多肽片段, 制备双(多)特异性抗体^[5]。但是, 目前将树状分子应用于小分子有害物抗体制备领域尚未有相关报道。

本文以 AMOZ 为模型, 首次尝试将其半抗原与树状分子偶联制备新型抗原, 探讨以树状分子替代传统载体蛋白作为载体在制备小分子化合物特异性抗体的可行性, 期望能够为其他小分子半抗原特异性抗体的制备提供方法借鉴。

1 材料与方法

1.1 仪器与试剂

赖氨酸树状分子 G5 (分子量 172300, 末端氨基数 964), 法国 COLCOM 公司; 牛血清蛋白 BSA、卵清蛋白 OVA、弗氏完全与不完全佐剂、N-羟基琥珀酰亚胺 (NHS) 和 N,N'-二环乙基碳二亚胺 (DCC), 美国 sigma 公司; HRP 标记的羊抗鼠 IgG 抗体, 武汉博士德生物工程有限公司; 乙醛酸、吐温-20, 上海阿拉丁试剂公司; 分析级 Na_2CO_3 、 NaHCO_3 、 KH_2PO_4 、 $\text{Na}_2\text{HPO}_4 \cdot 12\text{H}_2\text{O}$ 、KCl、浓硫酸、柠檬酸等, 广州化学试剂有限公司; HRP 显色用的 3,3',5,5'-四甲基联苯胺 (TMB), 上海碧云天生物技术有限公司; 脱脂奶粉, 华农三角市奇康超市; 实验用水均为 Milipore 超纯水; SPF 级 Balb/c 纯种雌性小鼠, 广东省医学实验动物中心。

Multiskan MK3 酶标仪、Wellwash MK2 洗板机, 美国 Thermo 公司; U-3010 紫外可见分光光度计, 日本 Hitachi 公司; 6K15 冷冻离心机, Sartorius-Sigma 公司。

酶联免疫测定(ELISA)用溶液。磷酸盐缓冲液

(PBS, 0.01 mol/L, pH 7.4)、碳酸盐缓冲液 (CB, 0.05 mol/L, pH 9.6)、洗涤液 (PBST, 0.01 mol/L, pH 7.4, PBS-0.5 mol/L 吐温 20)、封闭液 (5% 脱脂奶粉)、3,3',5,5'-四甲基联苯胺 (TMB) 底物液 (TMB-过氧化氢脲溶液)、终止液 (10% H_2SO_4 溶液)。

1.2 实验方法

1.2.1 半抗原合成与鉴定

半抗原 AMOZA 的合成。通过 AMOZ 的氨基与乙醛酸的醛基进行亲核加成反应, 设计合成一种具有双键手臂和活性羧基的半抗原 AMOZA (图 1)。具体方法如下: 称取 603 mg (3 mmol/L) AMOZ 和 266 mg (3.6 mmol/L) 乙醛酸分别溶于 2 mL 无水乙醇中, 搅拌过程中将乙醛酸滴加到 AMOZ 中, 室温搅拌反应过夜。反应结束, 真空抽滤, 依次用 2 mL 乙醇和乙醚洗涤滤饼, 得到白色沉淀, 即目标半抗原 AMOZA。采用质谱 (MS) 和核磁 (NMR) 进行结构鉴定。

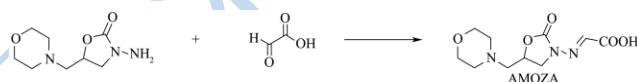


图 1 半抗原 H1 合成路线图

Fig.1 Route of synthesis of haptin H1

1.2.2 人工抗原合成与鉴定

人工抗原 AMOZA-BSA、AMOZA-G5 及 AMOZA-OVA 的制备。采用活泼酯法, 将半抗原 AMOZA 与牛血清蛋白(BSA)、赖氨酸树状分子(G5)或卵清蛋白(OVA)偶联制备人工抗原。半抗原 AMOZA 在二环己基碳二亚胺 (DCC) 的作用下, 与 N-羟基琥珀酰亚胺 (NHS), 生成活泼酯衍生物, 通过该中间产物与载体上的氨基反应形成酰胺键, 实现半抗原与载体的键合 (图 2)。具体方法如下: 取 25.7 mg (0.1 mmol/L) AMOZA 溶于 1 mL DMF 中, 搅拌加入 41.2 mg (0.2 mmol/L) DCC 和 23 mg (0.2 mmol/L) NHS, 4 °C 下磁力搅拌反应过夜, 离心后取上清为 A 液; 称取适量 BSA (G5 或 OVA) (AMOZA 与 BSA 和 OVA 的摩尔比分别控制在 80:1 和 60:1; 与 G5 的摩尔比控制在 482:1) 溶于 5 mL PBS 中, 搅拌溶解得 B 液; 磁力搅拌下, 将 A 液逐滴缓慢加入到 B 液中, 4 °C 反应过夜, 离心后取上清, 4 °C 下用 PBS 透析 3 d, 每天早晚更换 2 次透析液。分别得到 2 个免疫原 (AMOZA-BSA, 对照组, 图 3a; AMOZA-G5, 实验组, 图 3 b) 和 1 个包被原 (AMOZA-OVA, 图 3c), 以 1 mg/mL 分装于 0.5 mL 离心管中, 冻存于 -20 °C 冰箱中备用。采用紫外光谱法对偶联产物进行鉴定, 分别将偶联产物、载体、半抗原溶液在 220 nm~350 nm

波长间进行紫外吸收光谱测定, 鉴定半抗原 AMOZA 与载体 (BSA、G5 或 OVA) 是否偶联成功。

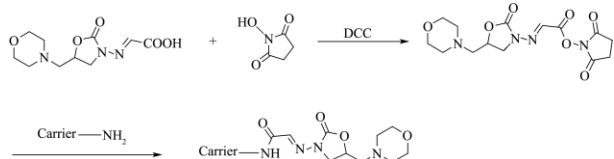


图2 人工抗原合成路线图

Fig.2 Route of synthesis of the antigen

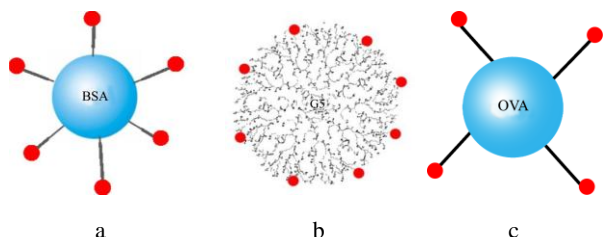


图3 3种人工抗原示意图

Fig.3 Schematic representations of 3 antigens

注: a: AMOZA-BSA; b: AMOZA-G5; c: AMOZA-OVA。

1.2.3 动物免疫与抗血清制备

将两种免疫原同时免疫 SPF 级周龄为 6~8 周的 *Balb/c* 纯种雌性小鼠。动物免疫过程如下: 将免疫原与弗氏佐剂 (初次免疫用完全弗氏佐剂, 以后均用不完全弗氏佐剂) 等体积混合乳化, 多点注射方式免疫 3 只 *Balb/c* 小鼠 (抗原 100 μg /只), 之后每隔三周加强免疫一次。第五次免疫 10 d 后断尾采血, ciELISA 测定抗血清效价, 待效价稳定后摘眼球取全血。12000 r/min 离心 10 min, 取上清即得小鼠抗血清, $-20\text{ }^{\circ}\text{C}$ 保存备用。

1.2.4 抗原 (AMOZ) - 抗体识别性能评价

采用间接竞争 ELISA (ciELISA) 检测是否有针对 AMOZ 的抗体产生, 测定识别活性。具体操作如下:

包板, 用 1 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 的 AMOZA-OVA 进行包板, 100 $\mu\text{L}/\text{孔}$, $37\text{ }^{\circ}\text{C}$ 孵育过夜; 洗板两次; 封闭, 加封闭液 120 $\mu\text{L}/\text{孔}$, $37\text{ }^{\circ}\text{C}$ 孵育 3 h, 甩干后倒置于 $37\text{ }^{\circ}\text{C}$ 烘箱中烘干 1 h; 点样, 效价列加药物稀释液以及梯度稀释的抗血清各 50 μL , 抑制列加浓度为 1 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 的 AMOZ 以及梯度稀释的抗血清各 50 μL , $37\text{ }^{\circ}\text{C}$ 孵育 40 min; 洗板 5 次, 拍干; 加酶标二抗, 加 5000 倍稀释的 HRP-IgG 二抗, 100 $\mu\text{L}/\text{孔}$, $37\text{ }^{\circ}\text{C}$ 孵育 40 min; 洗板 5 次, 拍干; 显色, 加显色液 100 $\mu\text{L}/\text{孔}$, $37\text{ }^{\circ}\text{C}$ 显色 10 min; 终止, 加终止液 50 $\mu\text{L}/\text{孔}$, 终止反应; 读数, 酶标仪测定各孔 450 nm 的吸光值 $A_{450\text{nm}}$; 计算抑制率。

1.2.5 抗体特异性评价

采用交叉反应率对所获得的抗体进行特异性评价, 交叉反应率越高, 特异性越差。方法同 1.2.4, 其

中点样步骤改为: 加入梯度稀释的 AMOZ 或其结构类似物以及一定稀释倍数的抗血清各 50 μL 。本研究选择的 AMOZ 的类似物包括: 呋喃它酮, 呋喃唑酮, 呋喃妥因, 呋喃西林, 呋喃唑酮代谢物 (AOZ, 3-氨基-2-噁唑烷酮), 呋喃妥因代谢物 (AHD, 1-氨基海因), 呋喃西林代谢物 (SEM, 氨基脲)。

1.2.6 数据分析

1.2.6.1 抗原 (AMOZ) - 抗体识别性能评价

采用 ciELISA 法, 得到 2 种抗血清不同稀释倍数的吸光值, 根据吸光度值计算抑制率。抑制率计算公式如下:

$$\text{抑制率}/\% = \left(\frac{A_{450\text{nm}}^{\text{效价列}} - A_{450\text{nm}}^{\text{抑制列}}}{A_{450\text{nm}}^{\text{效价列}}} \right) \times 100\% \quad (1)$$

注: 以抗血清的稀释倍数及相应的效价和抑制率采用 Origin 7.5 软件绘制双 Y 轴折线图。X 轴为抗血清的稀释倍数, Y 轴为吸光值和抑制率 (%)。

1.2.6.2 抗体特异性评价

采用 ciELISA 法, 得到不同 AMOZ 浓度的吸光度值。采用 Origin 7.5 软件四参数对数函数进行曲线拟合, X 轴为 AMOZ 浓度对数, Y 轴为吸光值。经计算得到 AMOZ 及其结构类似物的半抑制浓度 (IC_{50} , $\mu\text{g}/\text{mL}$), 并计算各结构类似物与抗血清的交叉反应率。交叉反应率计算公式如下:

$$\text{交叉反应率}(100\%) = \frac{\text{IC}_{50}(\text{AMOZ})}{\text{IC}_{50}(\text{结构类似物})} \times 100\% \quad (2)$$

2 结果与讨论

2.1 半抗原合成与鉴定

本研究对所得的半抗原 AMOZA 先经薄层层析鉴定纯度后, 再经 MS 和 NMR 进行精细结构鉴定, 结果表明半抗原合成成功。其表征数据如下: MS (ESI positive) m/z: 258 [M+H]⁺; $^1\text{H-NMR}$ (600MHz, d₅-Pyridine, TMS): δ 7.56 (s, 1H), 4.16 (t, J=8.8Hz, 1H), 3.79 (dd, J₁=6.7, J₂=8.8, 1H), 3.68-3.64 (m, 4H), 2.66 (dd, J₁=6.1, J₂=13.5, 1H), 2.62 (dd, J₁=5.5, J₂=13.4, 1H), 2.51-2.46 (m, 4H)。

2.2 人工抗原合成与鉴定

载体和半抗原一般在紫外下均有各自不同的吸收峰, 若半抗原成功偶联到载体蛋白上, 其偶联产物会同时具有载体和半抗原的特征吸收峰^[6]。载体、半抗原以及合成的人工抗原紫外扫描图如图 4 所示。由图 4a 可知, 载体 BSA 和 OVA 的特征吸收波长为 280 nm,

AMOZA 在 265 nm 左右出现显著吸收峰,而人工抗原 AMOZA-BSA 和 AMOZA-OVA 同时具备载体和半抗原的吸收特征,表明合成成功;由图 4b 可知,载体 G5 在大于 250 nm 时,无紫外吸收现象,而人工抗原 AMOZA-G5 在 250 nm~300 nm 之间有显著吸收,具备半抗原 AMOZA 的吸收特征,表明合成成功。

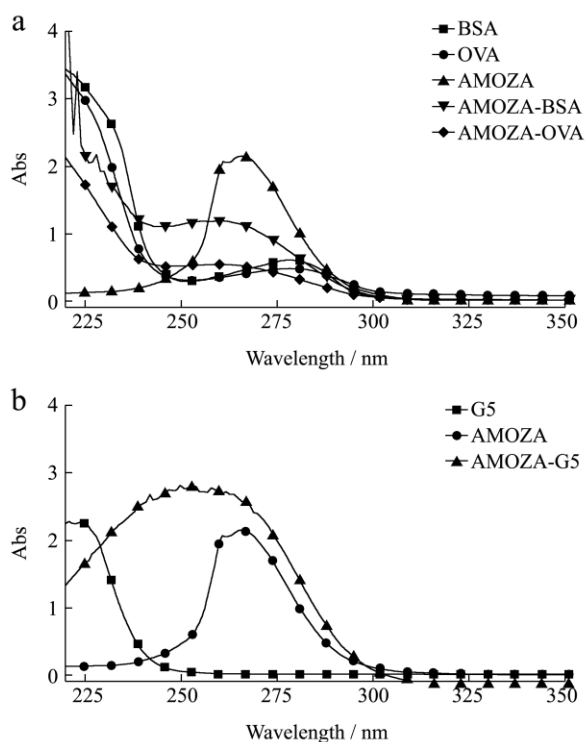


图 4 人工抗原紫外扫描图谱

Fig.4 Ultraviolet spectra of synthesized antigens

注: a: AMOZA-BSA/OVA; b: AMOZA-G5.

2.3 抗原 (AMOZ) - 抗体识别性能评价

抗血清的效价是指血清中所含抗体的浓度或含量,是评价动物免疫应答强弱的一个指标。一般来讲,抗原引起动物免疫应答越强烈,其抗血清效价就相对越高。抗血清的抑制率是评价抗血清对抗原特异性的标准,抑制率越高,抗血清对该抗原的特异性就越强,实际检测药物的结果更准确。

AMOZA-BSA 和 AMOZA-G5 分别作为免疫原免疫小鼠获得的抗血清分别记作 antiserum 1 和 antiserum 2。由 ciELISA 测定结果 (图 5) 可以看出: antiserum 1 在每个稀释梯度下,其效价列与抑制列吸光值基本相同,1 $\mu\text{g}/\text{mL}$ AMOZ 在 ciELISA 中对抗体无抑制现象,表明传统免疫原 AMOZA-BSA 未能刺激动物免疫应答产生特异性识别 AMOZ 的抗体; antiserum 2 在每个稀释梯度下,其抑制列吸光值明显低于效价列,1 $\mu\text{g}/\text{mL}$ AMOZ 在 ciELISA 中对抗体有明显抑制现象,

抑制率达到 35%,表明新型免疫原 AMOZA-G5 可以有有效的刺激动物免疫应答产生直接针对 AMOZ 的抗体;同时对比左右两个图可知, antiserum 2 的效价要明显低于 antiserum 1,表明 AMOZA-G5 引起的免疫应答强度要低于 antiserum 1。

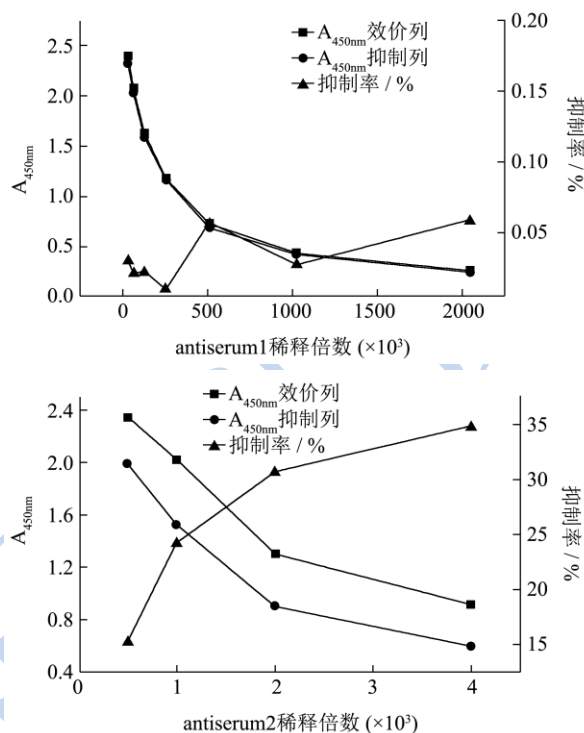


图 5 2 种抗血清的效价及抑制率折线图

Fig.5 Potency and inhibition rate curves of the two antisera

2.4 抗体特异性评价

对以 AMOZA-G5 为免疫原免疫获得的抗血清 (antiserum 2) 作特异性评价。交叉反应结果 (表 1) 表明,在该 ciELISA 检测体系下,该抗血清对其他三种硝基喹啉原药及其代谢衍生物均无交叉反应,特异性良好。说明该抗体对次级片段亚氨基吗啡啉基噁唑烷酮环有特异性识别,该次级结构片段与抗体口袋腔完全契合,抗体只识别固相包被原 AMOZA-OVA,因而这种识别作用不会受到其他药物的干扰。唯一出现明显交叉反应的是喹啉它酮原药,可能原因是 AMOZ 与其原药结构非常相似 (都含有亚氨基吗啡啉基噁唑烷酮环次级片段),这与相关研究所获得的抗体交叉反应结果一致^[7]。同时,由于喹啉它酮在动物体内迅速代谢分解为 AMOZ,因而动物样品中真正的残留物大多为 AMOZ,不易造成假阳性。另外,抗体与喹啉它酮有较高的交叉反应率,也使得该抗体可以用于饲料样品中是否添加了喹啉它酮抗生素的检测。

表 1 antiserum 2 对 AMOZ 结构类似物的交叉反应率

Table 1 Cross-reactivity of antiserum 2 against analogs of AMOZ

竞争物	结构	IC ₅₀ / (μg/mL)	交叉反 应率/%
AMOZ		8.28	100
呋喃它酮		4.40	188
呋喃唑酮		>8280	<0.1
呋喃妥因		>8280	<0.1
呋喃西林		>8280	<0.1
AOZ		>8280	<0.1
AHD		>8280	<0.1
SEM		>8280	<0.1

2.5 树状分子提高半抗原免疫原性的可能机理

目前, 树状分子已经成功应用于小分子肽抗体的制备, 应用于疫苗行业。本实验表明, 树状分子同样可以提高小分子半抗原的免疫原性, 用于一些超低分子量化合物抗体的制备。其机理可能为: ①增大了半抗原的密度, 增强了半抗原的免疫原性。研究表明, 增大抗原表位的密度能够显著地提高抗原的免疫原性以及免疫反应性^[8]。随着树状分子代数的增长, 其表面官能团数量呈指数增长, 得益于表面的大量官能团, 树状分子可以同时连接多个半抗原分子, 大大提高了半抗原的密度^[9]。传统的 BSA 理论上最多可以连接 35 个半抗原^[10], 相比之下, G5 由 963 个赖氨酸组成, 其表面分布有 964 个活性氨基, 均可用于半抗原的偶联, 大大提高了 AMOZ 半抗原的密度 (偶联比约为 450:1)。同时树状分子能够将半抗原密集地呈现在分子表面, 方便抗原呈递细胞 APCs 将其更好的处理并呈递于免疫细胞, 有助于产生更快、更强的免疫反应^[11]。②赖氨酸树状分子无免疫原性, 提高了抗体的特异性^[12]。传统的载体蛋白如 BSA 或 KLH 等, 由于结构复杂, 表面存在着较多结构复杂的氨基酸残基 (如苯环等), 往往能够引起动物的强烈免疫应答, 掩盖了半抗原的免疫原性^[13]。赖氨酸树状分子结构简单 (全

部由赖氨酸残基组成), 没有特征官能团, 因此其本身不易于引起动物免疫应答, 能够充分将半抗原分子暴露于动物的免疫系统中, 增强半抗原的免疫原性, 提高抗体的特异性。由图 5 可以看出, AMOZA-BSA 免疫小鼠获得的抗血清 antiserum 1 的效价 (以效价列 A_{450nm} 在 1.0 左右时所对应的抗血清稀释倍数记) (1:256000) 要远远高于 AMOZA-G5 免疫小鼠获得的抗血清 antiserum 2 的效价 (1:4000), 而相反在对游离 AMOZ 的识别能力方面, antiserum 2 相比 antiserum 1 能够特异性识别 AMOZ, 其原因可能是得益于 G5 的低免疫原性。在高偶联比的情况下, 以 G5 为载体的新型免疫原 AMOZA-G5 使得半抗原的免疫原性得以充分呈现, 因而导致了低效价高特异性的现象。同时, 有报道称树状分子偶联半抗原作为载体能够延长免疫反应持续的时间^[12]。

3 结论

3.1 本实验以呋喃它酮代谢物 AMOZ 为模型, 以赖氨酸树状分子(G5)为载体替代传统载体蛋白制备新型免疫原 AMOZA-G5, 通过 Balb/c 免疫, 成功制备了对 AMOZ 本身有较好识别作用的多克隆抗体, 与普通免疫原 AMOZA-BSA 相比, 有明显的优势, 表明以赖氨酸树状分子为载体可以有效提高小分子半抗原的免疫原性, 提高小分子半抗原的抗体质量。

3.2 但是, 从实验结果可知, 以 G5 为载体虽然能够有效增强 AMOZ 半抗原的免疫原性, 但其效果仍不能满足实际检测需求。下一步课题组将进一步研究不同代数的树状分子对增强半抗原免疫原性的作用, 甚至尝试将树状分子与传统载体蛋白偶联, 形成新的载体蛋白, 借助树状分子与传统蛋白的各自优势, 研究其在增强小分子半抗原免疫原性方面的作用。此外, 将尝试进行单克隆抗体的筛选, 以期获得灵敏度和特异性等性能显著提升的单克隆细胞株。还可以尝试建立一些超灵敏的分子方法如荧光增强免疫分析方法、电化学免疫传感器等, 争取可以用于实际样品的检测。

参考文献

- [1] Chappay O, Debray M, Niel E, et al. Association constants of monoclonal antibodies for haptens: heterogeneity of frequency distribution and possible relationship with haptens molecular weight [J]. *J. Immunol. Methods*, 1994, 172(2): 219-225
- [2] Pimpitak U, Putong S, Komolpis K, et al. Development of a monoclonal antibody-based enzyme-linked immunosorbent assay for detection of the furaltadone metabolite,

-
- AMOZ, in fortified shrimp samples [J]. *Food Chemistry*, 2009, 116: 785-791
- [3] Xu Z L, Shen Y D, Sun Y M, et al. Novel hapten synthesis for antibody production and development of an enzyme-linked immunosorbent assay for determination of furaltadone metabolite 3-amino-5-morpholinomethyl-2-oxazolidinone (AMOZ) [J]. *Talanta*, 2013, 103: 306-313
- [4] Li S Q, Song J Y, Yang H, et al. An immunochromatographic assay for rapid and direct detection of 3-amino-5-morpholino-2-oxazolidone (AMOZ) in meat and feed samples [J]. *J. Sci. Food Agric.*, 2014, 94: 760-767
- [5] 沈关心,周汝麟. 现代免疫学实验技术[M]. 武汉:湖北科学技术出版社,1998
- SHEN Guan-xin, ZHOU Ru-lin. Experiment technology of modern immunology [M]. Wuhan: Hubei Science & Technology Press, 1998
- [6] Tinashe B R, Victor J J, Paul D S. Production, characterization and utility of a panel of monoclonal antibodies for the detection of toluene diisocyanate haptenated proteins [J]. *J. Immunol. Methods*, 2011, 373: 127-135
- [7] Yan X D, Hu X Z, Zhang H C, et al. Direct determination of furaltadone metabolite, 3-amino-5-morpholinomethyl-2-oxazolidinone, in meats by a simple immunoassay [J]. *Food and Agricultural Immunology*, 2013, 23(3): 203-215
- [8] Tam J P. Synthetic peptide vaccine design: synthesis and properties of a high-density multiple antigenic peptide system [J]. *Natl. Acad. Sci.*, 1988, 85(15): 5409-5413
- [9] Tang S, Tomalia D A, Orr B G, et al. Regio-specific size, shape and surface chemistry designed dendrimers based on differentiated dendroid templates [J]. *New J. Chem.*, 2013, 37: 690-700
- [10] Singh P, Moll F R, Lin S H, et al. Starburst dendrimers: enhanced performance and flexibility for immunoassays [J]. *Starbu Clinical chemistry*, 1994, 40(9): 1845-1849
- [11] Heegaard P, Boas U, Sorensen N S. Dendrimers for vaccine and immunostimulatory uses. a review [J]. *Bioconjug Chem.*, 2010, 21(3): 405-418
- [12] Wang C Y, Looney D J, Li M L, et al. Long-term high-titer neutralizing activity induced by octameric synthetic HIV-1 antigen [J]. *Science*, 1991, 254(5029): 285-288
- [13] Aguilar R M, Talamantes F J, Bustamante J J, et al. MAP dendrimer elicits antibodies for detecting rat and mouse GH-binding proteins [J]. *Journal of Peptide Science*, 2009, 15(2): 78-88