

小分子抗原人工合成进展

王建华* 张冲

(重庆大学生物工程学院 重庆 400044)

摘 要 小分子免疫分析技术的应用日渐广泛,合成稳定的、具有良好免疫原性的人工抗原是制备单克隆抗体和建立免疫分析方法的前提和关键。本文对国内外半抗原的设计与合成方法、载体的选择、半抗原与载体的耦联方法等进行了综述,并对小分子抗原人工合成中相关的问题进行了讨论。

关键词 人工抗原,半抗原,合成,免疫分析

中图分类号:O621.3

文献标识码:A

文章编号:1000-0518(2011)04-0367-09

DOI:10.3724/SP.J.1095.2011.00364

近年来,食品中农药、兽药检测方法已成为研究热点,其中,以小分子为待测物的免疫分析技术发展迅速。免疫分析是以抗原与抗体的特异性结合反应为基础的新型分析技术。相对于传统检测方法,它具有简便、快速、灵敏度高和成本低廉、便于现场检测和高度特异性等特点。此外,免疫分析技术对药品鉴定、药物代谢研究、药材中农药和重金属残留的检验、解毒及环境监测等也具有重要意义^[1-4]。免疫分析几乎适用于所有生物活性物质的检测,其基本原理是以待测物合成人工抗原,经动物获取相应的单克隆抗体,然后建立和优化免疫分析程序进行检测。有效的人工抗原的合成是保证免疫分析的前提和关键,其合成途径可归纳为:先根据待测分子的结构设计合成具有活性基团的半抗原,然后依据免疫学原理选择适当的载体,最后用适当的方式将半抗原与载体相互耦联,形成载体-半抗原结合物,纯化后即得到人工抗原。近年来,国内外有关人工抗原合成过程中所涉及的半抗原的设计与合成方法、载体的选择、半抗原与载体的耦联方法等研究有了很大进展,本文对现代免疫分析中小分子人工抗原的合成关键技术和方法进行了总结和讨论。

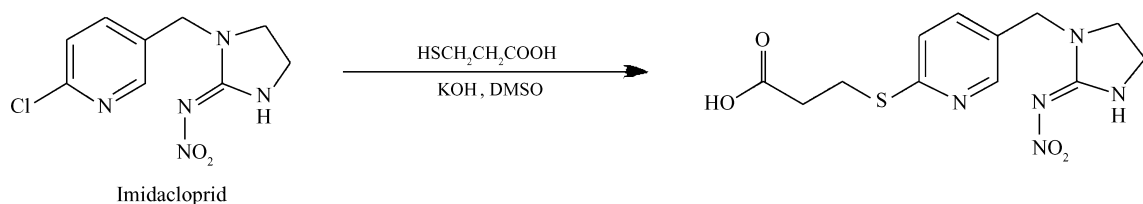
1 半抗原的设计与合成

1.1 半抗原的设计

半抗原是指具有反应原性,但不具备免疫原性,能与对应抗体结合出现抗原-抗体反应又不能单独激发人或动物产生抗体。

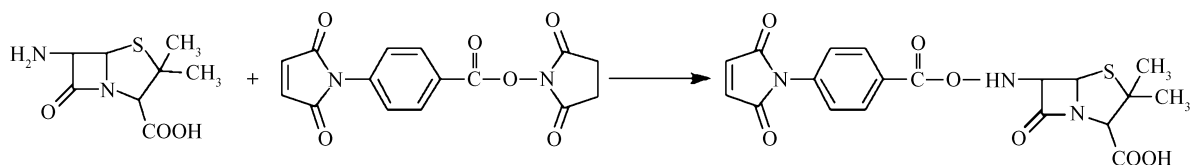
半抗原的设计与选择取决于待测物的分子结构,如果待测物本身具有一COOH、—NH₂、—OH 和—SH等活性基团,可直接通过交联剂与载体偶联,无需对药物结构进行改变即可以作为半抗原使用。若待测物本身没有可直接与载体共价连接的活性基团,或者虽然具有活性基团但这些基团对维系待测物的免疫特性十分重要而不能用作与载体偶联时,则必须根据免疫学理论并结合该待测物的自身结构进行半抗原的重新设计^[5]。应注意的是:首先半抗原的设计中应尽量保留待测物的特征基团,以保证获得的抗体能够与待测物发生特异性免疫反应,必要的时候还需要对这些基团进行保护;其次半抗原的结构还应具有一定的复杂性,如含有苯环、杂环和支链等高免疫活性的基团^[6],近年来也有研究显示在待测物上连接二肽基团可增强半抗原的免疫活性^[7]。

1.1.1 待测物自身的衍生化 如果待测物自身没有可直接与载体共价连接的基团,可首先考虑利用现有的非特殊构效关系基团,通过水解、氧化、还原和取代等反应产生相应的可连接基团作为半抗原。获得的连接基团应力求简单,往往以羧基、氨基为主,便于与载体偶联。含有酯基的待测物,如肱菌酯^[8],可在碱性条件下水解得到含有羧基的半抗原;有机磷类农药,如对硫磷、甲基对硫磷、杀螟硫磷以及拟除虫菊酯等其结构中均有一 NO_2 ,可通过锌、亚铁等还原剂在盐酸作用下还原成 $-\text{NH}_2$ ^[9-11];3-巯基丙酸可以取代待测物中氯原子而构建含有羧基的半抗原,如硝基亚甲基类内吸杀虫剂吡虫啉(Imidacloprid)与巯基丙酸在碱性溶液中缩合生成1-(6-羧乙基巯基-3-吡啶基甲基)-*N*-硝基亚咪唑烷-2-基胺,以此为半抗原获得了高免疫效价的抗体^[12],反应式如 Scheme 1 所示。



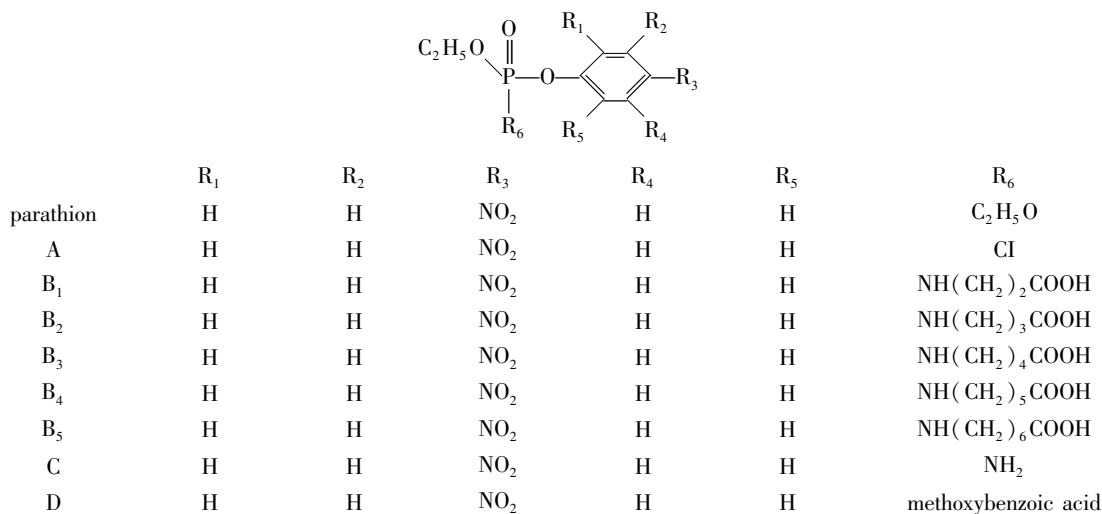
Scheme 1 Synthesis of the hapten of imidacloprid^[12]

1.1.2 由待测物的中间体合成半抗原 如果待测物本身没有可直接与载体共价连接的基团,且对待测物分子进行衍生化后会破坏维系待测物的免疫特性和特征结构而不能用作与载体偶联的,则可以考虑由待测物的中间体或降解、代谢产物来合成半抗原。如6-氨基青霉烷酸(6-APA)是 β -内酰胺类药物的母核,作为中间体参与 β -内酰胺类药的合成,其结构中既含有羧基又含有氨基,具有较高的反应活性。胥传来等^[13]以6-APA与*N*-(*p*-马来酰亚胺基苯甲酰氧基)琥珀酰亚胺(MBS)合成了 β -内酰胺类药物的通用半抗原,反应式如 Scheme 2 所示。



Scheme 2 Synthesis of the hapten of β -lactam antibiotics^[13]

1.1.3 由原料重新合成半抗原 为了保证人工抗原的免疫活性,有时需要选择适当的原料重新合成与待测物结构相似的半抗原。此外,通过替换某种原料往往可以得到多种半抗原,大大丰富了待测物的半抗原种类。如杀虫剂对硫磷(*O,O*-二乙基-*O*-(4-硝基苯基)硫代磷酸酯)具有多种结构的半抗原,其中多

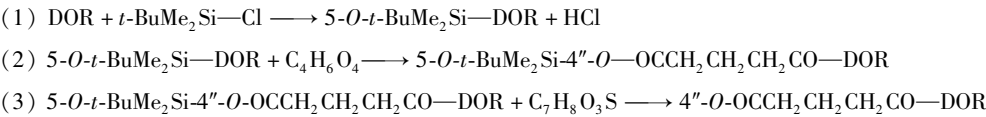
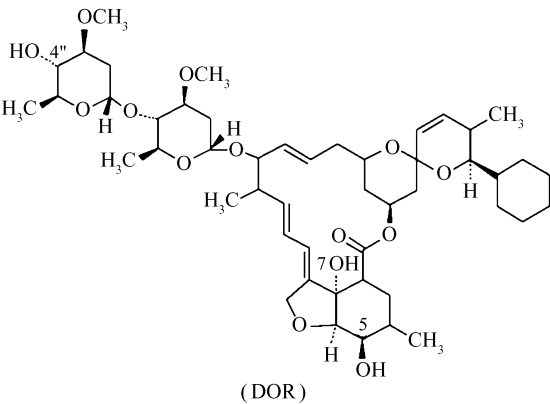


Scheme 3 Synthesis of the hapten of parathion^[14]

数由不同取代基团的同类原料合成。Liu 等^[14]以二氯硫代磷酸乙酯和对硝基苯酚合成半抗原 A;并将其与 $\text{H}_2\text{N}(\text{CH}_2)_n\text{COOH}(n:2 \sim 5)$ 在含 KOH 的甲醇溶液中反应获得半抗原 $\text{B}_1 \sim \text{B}_5$;与三乙胺在氨水中作用生成半抗原 C;与 4-羟基苯甲酸乙酯在含碳酸钾的乙腈中反应,所得产物再在碱性条件下水解得半抗原 D。

1.2 半抗原合成中特征基团的保护

在半抗原的合成过程中,为了保留待测物特征结构,突出待测物的免疫活性结构的同时在适当位置引入合适的活性基团,或者待测物自身具有多个相同基团时,需要对不与载体进行耦联的基团进行保护。如常用叔丁基、苄基和硅烷基等与羟基生成醚或酯来保护羟基。多拉菌素(DOR)结构较为复杂,含有 3 个羟基: $\text{C}_4'-\text{OH}$ 、 C_5-OH 和 C_7-OH 。由于 7 位 C 上羟基具有高位阻效应,难以进行反应,而选择 C_5-OH ,突出的是 DOR 的双糖部分,是非免疫活性部位,因此选择 $\text{C}_4'-\text{OH}$ 作为其半抗原合成的反应基团,同时也就需要对 C_5-OH 进行保护。何继红等^[15]以叔丁基二甲基氯硅烷($t\text{-BuMe}_2\text{Si-Cl}$)与多拉菌素的 C_5-OH 结合形成叔丁二甲硅醚,避免其参与 4 位 C 上羟基与琥珀酐($\text{C}_4\text{H}_6\text{O}_4$)的反应,并以对苯磺甲酸($\text{C}_7\text{H}_8\text{O}_3\text{S}$)将保护基脱去,得到半抗原 4''-O—单琥珀酰 DOR。反应式如 Scheme 4 所示。



Scheme 4 Synthesis of the hapten of parathion^[15]

2 载体的选择

半抗原由于自身分子量小,需要与大分子载体结合来获得免疫原性。这就要求载体具有较多能与半抗原结合的位点,这些位点又以氨基和羧基为主。最常用的为蛋白类载体,包括牛血清蛋白(BSA)、人血清蛋白(HAS)、兔血清蛋白(RSA)、卵清蛋白(OVA)、钥孔血蓝蛋白(KLH),以及小鼠血清白蛋白(MSA)、小鼠 IgM(MIM)、小鼠全血清(MWS)、破伤风类毒素(TT)、嗜水气单胞菌(AHJ)、虾全血蛋白(SWS)等。其它类型的载体还有多肽聚合物,如多聚赖氨酸(PLL);大分子聚合物,包括羧甲基纤维素、聚乙烯吡咯烷酮等。牛血清蛋白质是最常用的蛋白类载体。不仅因其具有物理化学性质稳定、不易变性、价廉易得等特点,还因其分子中赖氨酸含量较高,分子内自由氨基较多,且在不同 pH 值、离子强度及有机溶液存在下均能保持较大的溶解度,易与半抗原进行交联。卵清蛋白也具有便宜易得的特点,多用以制备包被原^[16]。多聚赖氨酸(PLL)分子量可达到十万到几十万道尔顿,自身免疫原性低但可以增加半抗原的免疫性,有利于机体产生特异性更高的抗体,且具有 10 倍于 BSA 的自由氨基^[17],是优良的载体。能被体内分解的大分子聚合物皆可与半抗原结合,且加入弗氏佐剂可诱导动物产生高效价的抗体,但国内实际应用较少。

选择载体时需要根据人工抗原的用途来考虑载体对检测系统的影响,即所选载体不应与检测体系发生交叉反应。例如,以免疫分析法来测定血液样品中待测物的含量时,应尽量避免选用血清类蛋白作

为载体。不过,近年来抗原提呈细胞的研究提示自身蛋白也能够作为人工抗原的载体^[18],其原理还未见明确的阐述,尚需进行具体实验验证。

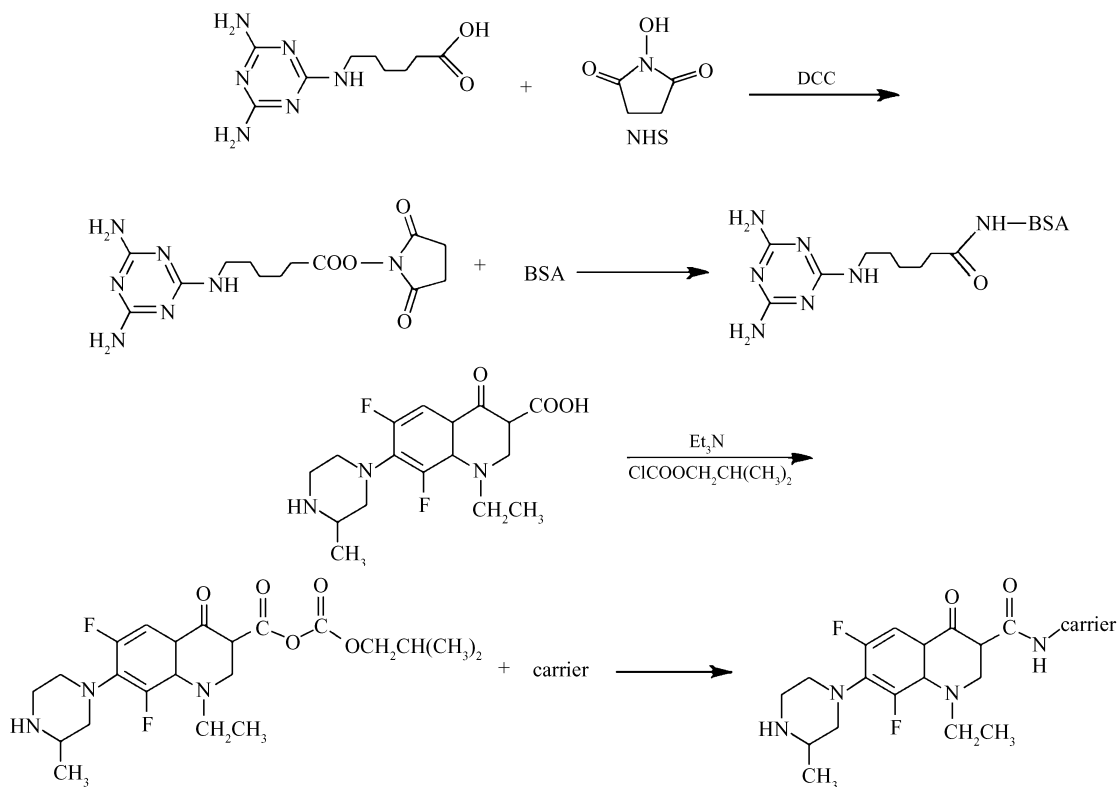
3 半抗原与载体的耦联

3.1 常见基团的耦联方法

大多数半抗原虽然具有一定的活性基团,但仍不能与载体直接耦联,且部分半抗原直接与大分子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,影响机体免疫系统的识别^[19]。这就需要使用交联剂对半抗原的基团进行活化,然后再与载体上的羧基、氨基、巯基等基团耦联形成人工抗原。同时有些引入的交联基团并不脱去,从而将半抗原与载体隔开,成为间隔臂。研究表明,一定长度的间隔臂的引入可使半抗原突出于载体表面,易为机体免疫系统识别,使产生针对半抗原的抗体的可能性增加。

根据半抗原基团的不同,耦联方法主要有以下几种。

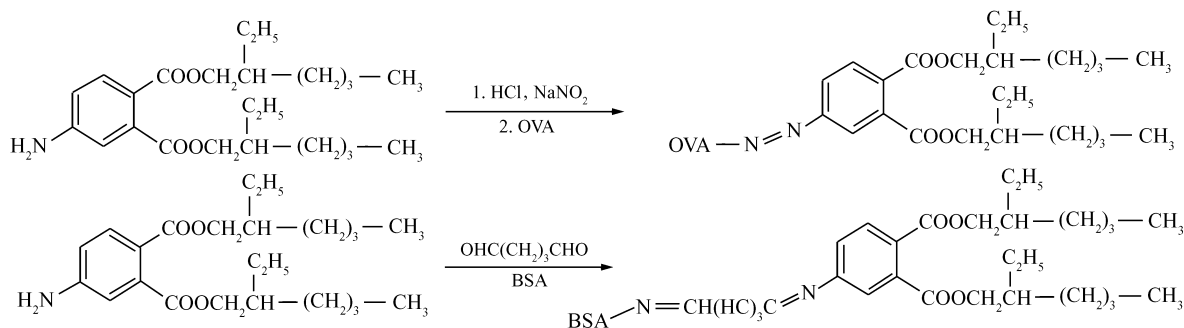
3.1.1 羧基耦联方法 羧基具有较强的反应活性,含有羧基的半抗原与载体耦联的方法比较多,具体有 *N*-羟基琥珀酰亚胺(NHS)活性酯法、混合酸酐法、碳二亚酰法、烷基氯甲酸法和 Woodward 试剂法等。其中以 *N*-羟基琥珀酰亚胺与碳二亚酰联用和混合酸酐法最常用。前者是在碳二亚酰类药品(一般使用 1-乙基-(3-二甲氨基丙基)碳酰二亚胺(EDC)或环己基碳酰二亚胺(DCC))的脱水作用下,NHS 的 N—OH 与半抗原的羧基在避光条件下结合生成活性中间产物,再与载体氨基形成稳定的肽键;后者则先以氯甲基异丁酯与含有羧基的半抗原反应形成混合酸酐,再与蛋白质载体上的氨基反应形成肽键。Lei 等^[20]以 NHS 与 DCC 联用的方法将三聚氰胺的半抗原与牛血清蛋白(BSA)进行偶联得到人工抗原,杜付彬等^[21]以氯甲基异丁酯法合成了洛美沙星的人工抗原,其制备路线如 Scheme 5 所示。



Scheme 5 The combination of NHS, DCC or EDC and mixed acid anhydride methods^[21]

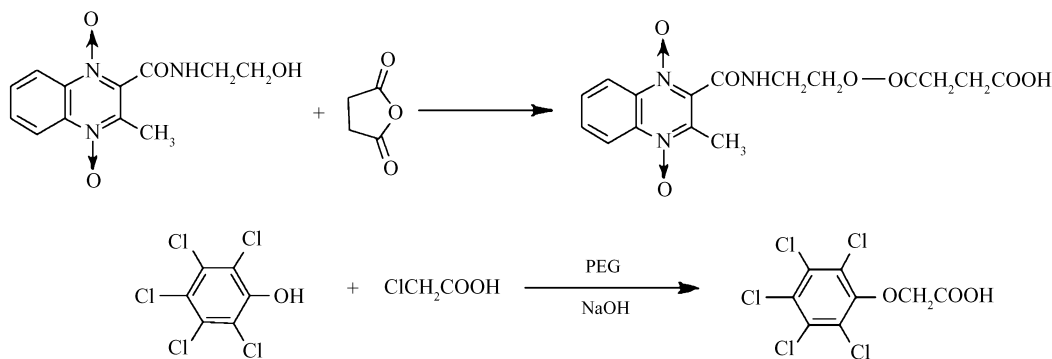
3.1.2 氨基耦联方法 氨基偶联的方法也比较多,常用的有重氮耦联法、戊二醛交联法、异氰酸酯法、曼尼希反应法、丙烯酸法等,其中戊二醛交联法与重氮耦联法最常用。重氮耦联要求半抗原含有芳伯氨

基,首先芳伯氨基在盐酸环境下与亚硝酸钠形成重氮盐,重氮盐不稳定,继而与载体的氨基偶联;重氮盐也能与载体的酪氨酸残基上的酚羟基、组氨酸残基上的咪唑环或色氨酸残基的吲哚环反应偶联。戊二醛法对半抗原的氨基没有特殊要求,且反应条件温和,能够在室温下中性水溶液中进行,在使用戊二醛法这类双功能交联试剂对半抗原和载体进行偶联时必须注意是,为防止半抗原分子间的反应,操作时应将半抗原溶液缓慢滴加至双功能交联试剂中,保证半抗原完全一对一的与双功能交联试剂偶联。在以4-氨基邻苯二甲酸(2-乙基己基)酯作为半抗原,合成邻苯二甲酸(2-乙基己基)酯(DEHP)人工抗原的研究中,Wei等^[22]采用重氮偶联法与戊二醛交联法将苯环4位的氨基分别和卵清蛋白(OVA)与牛血清蛋白(BSA)的氨基偶联,得到了2种人工抗原,其制备路线如Scheme 6所示。



Scheme 6 The diazotization and glutaraldehyde methods^[22]

3.1.3 羟基、酚基偶联法 羟基难以直接与载体偶联,一般先采用琥珀酸酐将其修饰成羧基,再与载体偶联的方法。琥珀酸酐可与半抗原的羟基反应生成半抗原-琥珀酸酐酯,即在羟基基础上构建具有羧基的间隔臂。与此类似,酚基可以与氯乙酸反应生成带有羧基的间隔臂。如喹乙醇的支链中含有一个羟基,其人工抗原的合成中就利用琥珀酸酐与羟基在吡啶溶液中连接^[23];又如在聚乙二醇(PEG)的催化作用下,五氯酚与氯乙酸在NaOH溶液中也可以进行连接^[24],其反应如Scheme 7所示。



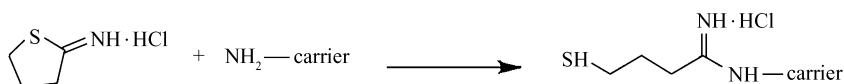
Scheme 7 The succinic anhydride and chloroacetic acid methods^[24]

3.1.4 其它基团的偶联方法 含有巯基的半抗原可以利用双功能交联试剂与载体中的巯基偶联,这类双功能交联试剂主要有N,N'-邻苯基双马来酰亚胺,具有反应条件温和、选择性高的特点,但也要注意防止同类分子的交联。其它双功能交联试剂还有N-羟基琥珀酰亚胺基-3-(2-吡啶基二硫)-丙酸酯(SPDP)、N-羟基琥珀酰亚胺基-4-(对马来酰亚胺基)-苯丁酸酯(SMPB)等。含酮基的半抗原可以采用(O-羧甲基)羟胺法或利用对-胍基苯甲酸法构建含羧基的连接臂,再以羧基偶联方法与载体偶联。糖类或者糖基化合物分子中邻二醇结构可以通过过碘酸钠氧化为醛基,然后再与载体中氨基形成Schiff碱的方法实现偶联^[25]。

3.2 载体的活化

为提高偶联的效率,有时需要对载体进行活化处理,以增加载体中适于偶联的基团数量,实际操作中可以自行对载体进行活化也可以购买活化后的载体。巯基是一类经常参与偶联的基团,但是天然氨

基酸中只有甲硫氨酸和半胱氨酸含有巯基,限制了载体中巯基的数量。载体巯基化主要是利用 2-亚氨基硫烷盐酸盐与载体中的氨基反应得到含巯基的支链结构^[26],反应式如 Scheme 8 所示。



Scheme 8 Mercapto group linked to the carrier^[26]

刘必勇等^[27]以摩尔比 50:1 的 2-亚氨基硫烷和钥孔血蓝蛋白(KLH)在硼酸盐缓冲液中,22 °C 下反应 1 h,反应后的混合物过截留相对分子质量为 30 000 的超滤膜后浓缩离心,得到巯基化的匙孔血蓝蛋白。

3.3 重金属与载体的偶联

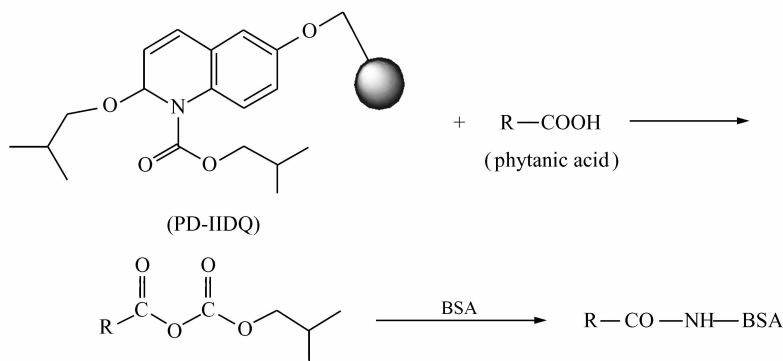
重金属显然不具备直接与载体偶联的能力,且重金属离子可使蛋白类载体变性沉淀,因此不能与蛋白类载体直接接触。现有研究中多以 EDTA、异硫氰酸苄基二胺四乙酸(ITCBE)和二乙烯三胺五乙酸(DTPA)为双功能交联剂,与重金属离子反应得到的重金属螯合物作为半抗原。张云显等^[28]分别以 EDTA 和 DTPA 在硝酸溶液中对镉离子进行螯合,获得了 2 种半抗原溶液,再分别与卵血清蛋白(OVA)和匙孔血蓝素(KLH)偶联,合成 2 种重金属镉螯合物人工抗原: Cd-DTPA-OVA 和 Cd-EDTA-KLH。除镉外,锌和汞等重金属的人工抗原也可以用类似方法合成^[29-30]。

3.4 多簇人工抗原的合成

在实际生产中,食品和环境往往残留多种有害物,单组分检测难以达到快速准确的要求,为此开发合成多簇人工抗原成为新的趋势。多簇人工抗原是由多种半抗原与同一载体进行偶联得到的人工抗原,其合成步骤需要分步进行,即将半抗原依次连接到载体上,每步的合成方法与前面提到的偶联方法相似。Wang 等^[31]将甲基对硫磷、毒死蜱、三唑磷和克百威 4 种农药的半抗原偶联到 BSA 分子上,得到带有 4 种农药分子抗原决定簇的多簇人工抗原,具有良好的免疫原性。

3.5 聚合物支载偶联试剂的应用

随着绿色化学的兴起,关于聚合物支载试剂(Polymer-Supported Reagents)的研究^[32]越来越引起人们的兴趣。许多具有良好性质的聚合物支载试剂被陆续报道,其中不乏可应用于半抗原与载体偶联的支载试剂。如 PS-IIDQ、PS-EDC、PS-DCC、PS-TBTU 和 PS-BOP 等,此类偶联试剂兼具液相反应的传统优势和固相反应的易操控性,具有易分离、可回收、可循环利用、产物易纯化和可使用过量试剂等优点。Sathe 等^[33]首先将这一技术应用于植烷酸人工抗原的合成中,利用聚苯乙烯支持的 1-异丁氧羰基-2-异丁氧基-二氢喹啉(PS-IIDQ)将植烷酸的半抗原与牛血清蛋白偶联得到植烷酸(phytanic acid)的人工抗原(见 Scheme 9),并通过平行试验比较证明 PS-IIDQ 的偶联催化能力强于 PS-DCC 和 PS-EDC。该方法能够大大简化人工抗原的提纯工作,预期在人工抗原合成领域将会得到更多的应用。



Scheme 9 Synthesis of the antigen of phytanic acid by PS-IIDQ^[33]

4 人工抗原的鉴定方法

为定性判定半抗原与载体是否耦联成功和定量测定二者的结合比,需要对纯化后的人工抗原进行鉴定。最主要的鉴定方法有紫外扫描法、红外扫描法、SDS 聚丙烯凝胶电泳和标记抗原示踪法。通过对比半抗原、载体和人工抗原的紫外扫描图谱和红外图谱,比较特征峰的吸收特征,可以判断和确认半抗原与载体是否成功耦联;同时利用紫外吸收的加和性原理,根据结合比计算公式: $(\epsilon_{\text{人工抗原}} - \epsilon_{\text{载体}}) / \epsilon_{\text{半抗原}}$, 可获得半抗原结合比。SDS 聚丙烯凝胶电泳可以直观地在凝胶上显示出人工抗原和蛋白类载体的条带,并通过蛋白质分子相对迁移率计算结合比。标记抗原放射性示踪法则是在制备人工抗原时,将一定量的标记半抗原与载体结合,反应结束后通过测定纯化前后的放射强度计算结合比。除此之外,还可以采用元素分析、核磁共振等方法对人工抗原进行鉴定,但相对成本较高,操作较复杂,研究报道也较少。

5 结论和展望

目前,对于人工抗原的合成国内外已有较多报道,其合成路线也日渐成熟,有不少经验可以总结借鉴,其合成技术也在不断发展,相信聚合物支载试剂在这一领域具有广泛的应用前景。尽管合成方法有了很大的发展,但是所得到人工抗原的免疫原性差异较大,部分人工抗原不能完全满足免疫分析的要求。由于免疫应答具有其复杂性,对于一个具体的待测物,其人工抗原的合成要根据自身结构特征具体分析与对待,需要设计、组合出多套方案,如从不同位置引入不同性质的基团、不同长度的间隔臂,将半抗原与多种载体相结合,通过改变投料比例获得不同结合比的人工抗原等等。通过免疫活性测试,优化筛选制备方案。因此,人工抗原合成研究不单纯是化学合成问题,亦涉及免疫学原理,如何根据免疫学原理合成具有较高免疫原性的人工抗原是该领域的重要研究方向。

参 考 文 献

- [1] Li P W, Zhang Q, Zhang W, *et al.* Development of a Class-specific Monoclonal Antibody-based ELISA for Aflatoxins in Peanut[J]. *Am Food Chem*, 2009, **115**: 313-317.
- [2] GONG Xiujie. The Analytical Technique of Veterinary Drugs[J]. *Xinjiang Xumuye(Xinjiang Anim Husb J)*, 2008, (6): 54-61 (in Chinese).
宫秀杰. 兽药残留分析技术[J]. *新疆畜牧业*, 2008, (6): 54-61.
- [3] Zhou H Y, Zhou B, Pellett S, *et al.* Selection and Characterization of Ahuman Monoclon Alneutralizing Antibody for Clostridium Botulinum Neurotoxin Serotype B[J]. *Bioorg Med Chem Lett*, 2009, **19**: 662-664.
- [4] Ren X F, Zhang F M, Chen F J. Development of a Sensitive Monoclonal Antibody - based ELISA for the Detection of Clenbuterol in Animal Aissues[J]. *Food Agric Immunol*, 2009, **20**: 333-344.
- [5] Kolar V, Deng A P, Franek M. Production and Characterization of Generic Antibodies Against S-triazine and Sulfonylurea Herbicides[J]. *Food Agric Immunol*, 2002, **14**: 91-105.
- [6] BEN Yali, ZHU Derui, LIU Deli. Design and Selection of Synthesis Methods of Artificial Antigens for Pesticides[J]. *Agrochemicals*, 2008, **47**(1): 10-14 (in Chinese).
贾亚俐, 朱德锐, 刘德立. 农药人工抗原合成方法的设计与优选[J]. *农药*, 2008, **47**(1): 10-14.
- [7] Mercader J V, Suarez-Pantaleon C, Agullo C, *et al.* Hapten Synthesis and Monoclonal Antibody-based Iimmunoassay Development for Detection of the Fungicide Trifloxystrobin[J]. *J Agric Food Chem*, 2008, **56**: 2581-2588.
- [8] Mercader J V, Suarez-Pantaleon C, Agullo C, *et al.* Hapten Synthesis and Monoclonal Antibody-based Immunoassay Development for Detection of the Fungicide Kresoxim-methyl[J]. *J Agric Food Chem*, 2008, **56**: 1545-1552.
- [9] JIA Minghong, QIAN Chuanfan, HAN Lijun, *et al.* The Composition and Identification of Parathion-methyl[J]. *Chinese J Pestic Sci*, 2003, **5**(2): 22-32 (in Chinese).
贾明宏, 钱传范, 韩丽君, 等. 甲基对硫磷人工抗原的合成与鉴定[J]. *农药学报*, 2003, **5**(2): 22-32.
- [10] Qian G L, Wang L M, Wu Y R, *et al.* A Monoclonal Antibody-based Sensitive Enzyme-linked Immunosorbentassay

- (ELISA) for the Analysis of the Organophosphorous Pesticides Chlorpyrifos – methyl in Real Samples[J]. *Food Chem*, 2009, **117**:364-370.
- [11] Lee H J, Cho S S, Simkhada J R, *et al.* Monoclonal Antibody Production and Immunochemical Detection of Polyether Antibiotics[J]. *Arch Pharm Res*, 2009, **32**:437-441.
- [12] Zhu G N, Gui W H, Zheng Z T, *et al.* Synthesis and Identification of Artificial Antigen for Imidacloprid[J]. *Agric Sci China*, 2006, **5**:307-312.
- [13] XU Chuanlai, MA Wei, PENG Chifang, *et al.* A Blending Method for Artificial Antigen of Cephalosporins: CN 101307092A, 2009-11-19 (in Chinese).
胥传来, 马伟, 彭池方, 等. 一种 β -内酰胺类药物通用人工抗原的合成方法: 中国, 101307092. A[P], 2009-11-19.
- [14] Liu Y H, Jin M J, Gui W J, *et al.* Hapten Design and Indirect Competitive Immunoassay for Parathion Determination: Correlation with Molecular Modeling and Principal Component Analysis[J]. *Anal Chim Acta*, 2007, **591**:173-182.
- [15] HE Jihong, SHEN Jianzhong, HOU Xiaolin. Synthesis and Identification of Artificial Antigen for Doramection[J]. *Chinese J Veter Med*, 2005, **41**(1):15-17 (in Chinese).
何继红, 沈建忠, 侯晓林. 多拉菌素人工抗原的制备与鉴定[J]. 中国兽医杂志, 2005, **41**(1):15-17.
- [16] Duan Z H, Lin Z S, Yao H R, *et al.* Preparation of Artificial Antigen and Egg Yolk-derived Immunoglobulin(IgY) of Citrinin for Enzyme-linked Immunosorbent Assay[J]. *Biomed Environ Sci*, 2009, **22**:237-243.
- [17] Tamps P T. Recent Advances in Multiple Antigen Peptides[J]. *Immunol Methods*, 1991, **196**:17-32.
- [18] Kim J V, Latouche J B, Riviere I, *et al.* The ABCs of Artificial Antigen Presentation[J]. *Nat Biotechnol*, 2004, **22**:403-408.
- [19] Sheedy C, MacKenzie C R, Hall J C. Isolation and Affinity Maturation of Hapten-specific antibodies[J]. *Biotechnol Adv*, 2007, **25**:333-352.
- [20] Lei H T, Shen Y D, Song L J, *et al.* Hapten Synthesis and Antibody Production for the Development of a Melamine Immunoassay[J]. *Anal Chim Acta*, 2010, **665**:84-90.
- [21] DU Fubin, TAN Jianhua. Synthesis and Identification of Iomefloxacin Artificial Antigen[J]. *J Trad Chinese Vet Med*, 2007, (2):5-7 (in Chinese).
杜付彬, 谭建华. 洛美沙星人工抗原的合成及鉴定[J]. 中兽医医药杂志, 2007, (2):5-7.
- [22] Wei C X, Zhao W, Zhang Y B, *et al.* Artificial Antigen Synthesis and Antibody Production for Di(2-ethylhexyl) Phthalate [J]. *Lab Environ Sci*, 2009, **6**:1-4.
- [23] ZHU Xuejia, CHEN Jinlan, HE Jiguo. Synthesis and Characterization of Artificial Antigen of Olaquinox[J]. *Food Sci*, 2008, **29**(5):129-133 (in Chinese).
朱学加, 陈金兰, 何计国. 喹乙醇人工抗原的合成及鉴定[J]. 食品科学, 2008, **29**(5):129-133.
- [24] YU Yuyan, TANG Yashu, ZHUANG Huisheng. Synthesis of Artificial Antigen and Production of Polyclonal Antibody for Pentachlorophenol[J]. *J Agro-Environ Sci*, 2007, **26**(1):314-317 (in Chinese).
余宇燕, 唐舒雅, 庄惠生. 五氯酚人工抗原的合成与多克隆抗体的制备[J]. 农业环境科学学报, 2007, **26**(1):314-317.
- [25] HONG Xiaozhuang, SUN Manji. The Technology for Protein Connection[M]. Beijing: Chinese Medical Science and Technology Press, 1993:2-56 (in Chinese).
洪孝庄, 孙曼荠. 蛋白质连结技术[M]. 北京: 中国医药科技出版社, 1993:2-56.
- [26] Pawlowski A, Kallenius G, Svenson S B. A New Method of Non-cross-linking Conjugation of Polysaccharides to Proteins via Thioether Bonds for the Preparation of Saccharide-protein Conjugate Vaccines[J]. *Vaccine*, 1999, **17**:1474-1483.
- [27] LIU Biyong, JIAO Hong, WANG Jiaji. Synthesis and Identification of Conjugate Antigen of Palytoxin[J]. *Chinese J Biochem Pharm*, 2005, **26**(4):196-199 (in Chinese).
刘必勇, 焦红, 王家骥. 岩沙海葵毒素人工抗原的合成及鉴定[J]. 中国生化药物杂志, 2005, **26**(4):196-199.
- [28] ZHANG Yunxian, LIU Faying, YANG Hui, *et al.* Synthesis and Identification of Artificial Antigen for Heavy Metal Cadmium Chelate[J]. *J Anhui Agric Sci*, 2009, **37**(14):6319-6321 (in Chinese).
张云显, 刘发英, 杨慧, 等. 重金属镉螯合物人工抗原的合成与鉴定[J]. 安徽农业科学, 2009, **37**(14):6319-6321.
- [29] Guo M, Pang S Q. Synthesis, Characterization and Immunoassay of the Artificial Antigen for Cadmium(II)[J]. *Asian J Chem*, 2009, **21**(7):5621-5631.

- [30] Lou Y, Yang F L, Zhu X X, *et al.* Production of a Specific Monoclonal Antibody Against Mercury-chelate Complexes and its Application in Antibody – based Assays[J]. *Food Agric Immunol*, 2009, **20**(1):23-33.
- [31] Wang S T, Gui W J, Guo Y R, *et al.* Preparation of a Multi-hapten Antigen and Broad Specificity Polyclonal Antibodies for a Multiple Pesticide Immunoassay[J]. *Anal Chim Acta*, 2007, **587**:287-292.
- [32] Clark J H, Macquarrie D J. Handbook of Green Chemistry and Technology[M]. Chapt 8. Wiley-Blackwell:2002:3.
- [33] Sathe M, Derveni M, Allen M, *et al.* Use of Polystyrene-supported 2-Isobutoxy-1-isobutoxycarbonyl-1, 2-dihydroquinoline for the Preparation of a Hapten-protein Conjugate for Antibody Development[J]. *Bioorg Med Chem Lett*, 2010, **20**:1792-1795.

Recent Progress in Synthetic Methods of Small Molecule Antigen

WANG Jianhua^{*}, ZHANG Chong

(College of Biomedical Engineering, Chongqing University, Chongqing 400044)

Abstract With increasing applications of immune assay, the synthesis of artificial antigen with good stability and immunogenic is the key and premise to prepare the antibody and to establish the method for small molecule immune assay. The progress of synthesis and design method of hapten, carrier selection and the couple method of hapten with carrier are reviewed in this paper. In addition, some questions of the synthesis of small molecule artificial antigen were also discussed.

Keywords artificial antigen, hapten, synthesis, immune assay