

# 糖类物质单克隆抗体研究进展

## Research development of monoclonal antibody of saccharide

甘 丽, 辛现良, 耿美玉

(中国海洋大学 药物与食品研究所, 山东 青岛 266003)

中图分类号: R967 文献标识码: A 文章编号: 1000-3096(2006)10-0087-05

自 1975 年杂交瘤技术问世以来, 单克隆抗体以其绝对的纯一性、高特异性、高灵敏度等特点, 在生命科学研究、临床诊断中发挥着极其重要的作用。随着生物技术的发展, 各种适应人类需要的新型基因工程单抗相继出现, 但鼠源性单抗作为最初的源头仍有着极广泛的应用。较强的免疫原性和灵敏的抗体检测方法是制备出特异性好的鼠源性单抗的前提。蛋白质、多糖、DNA 等均可制备出相应的单抗。

糖类物质是生命体的能源及结构物质, 具有抗凝血、抗病毒、抗氧化、神经营养和保护等多种生物学活性<sup>[1]</sup>; 亦涉及细胞的识别、黏附、分化、代谢调节及某些重大疾病的发生发展等生物过程<sup>[2]</sup>。糖类物质单抗的制备对于揭示糖类物质在机体内的代谢过程、阐明糖类物质的生物学功能, 乃至于诊断和治疗与之相关的疑难病症, 都具有重要的意义。但大多数糖类物质主要含一些重复的寡糖片段, 为弱抗原或半抗原, 在获得良好的免疫应答和融合细胞抗体阳性率方面, 难度大于蛋白质和颗粒性抗原。文献报道, 除了 Waldenstrom 巨球蛋白血症等少数病人体内有极低水平的抗肝素抗体 ( $< 0.5 \text{ mg/L}$ ) 外, 服用肝素的病人体内没有发现抗肝素的抗体, 这充分说明了糖类物质免疫原性低的特点<sup>[3]</sup>。而且, 糖类物质尤其是小分子量的糖不易直接吸附在玻璃、聚苯乙烯塑料上, 给抗体检测带来很大不便。因此, 糖类物质单抗的制备技术一直处于不断探索之中。近年来, 糖类物质作用的逐步认识及分离纯化技术的发展, 推动了其单抗的大量制备和研究, 糖类抗原物质制备方法及抗体的检测方法也得到了不断的优化, 现综述如下。

### 1 糖类抗原的制备

对于制备鼠源性单抗来说, 免疫动物的效果是关系到能否获得特异性单抗的重要环节。免疫是一个重复多次的过程, 虽然合理的免疫方案能在一定程度上提高免疫反应, 增加抗体滴度, 但抗原的免疫原性是免疫效果好坏的根本因素。糖类物质免疫原

性低, 为 T 细胞非依赖型, 单独作为免疫原很难产生高滴度的抗体, 因此怎样提高糖类物质免疫原性是研究者们一直关注的焦点之一。

#### 1.1 天然糖抗原

糖类物质单抗的研究始于 20 世纪 80 年代初, 比较早的有内源性多糖和病原菌荚膜多糖。

硫酸乙酰肝素、硫酸软骨素、硫酸角质素等内源性多糖为糖胺聚糖, 多以蛋白聚糖形式存在于生物体内, 是生物体内的结构物质和生物活性物质。早期这些糖胺聚糖单抗的制备就是以蛋白聚糖作为免疫原, 分别筛选出针对蛋白聚糖中的蛋白和多糖的单抗<sup>[4-7]</sup>。这些单抗广泛被应用于免疫组化中以揭示机体病理变化, 以及检测疾病状态时体液中蛋白聚糖含量的变化。

荚膜多糖是病原菌毒性的主要因子, 分离出来后, 可制备成疫苗, 所以一些临床易感病菌及家畜易感病菌单抗的制备也就主要集中在荚膜多糖。荚膜多糖单抗的制备经常以细菌细胞或细胞膜的提取物作为免疫原<sup>[8,9]</sup>, 其单抗对于病菌的血清分型和诊断很有帮助。其中研究较多的是新型隐球菌 (*Cryptococcus neoformans*) 荚膜多糖。隐球菌感染是艾滋病患者中第二大真菌感染疾病, 诱发脑膜炎, 10% 的病人因此而遭受着生命威胁。

#### 1.2 人工合成糖抗原

随着糖类物质分离提纯技术的发展和免疫应答机理研究的深入, 单抗制备采用多糖与载体耦联而制备的人工免疫原来增强免疫效果, 可以增加目的抗原抗体的产生。前面提到制备内源性多糖和病原菌荚膜多糖的单抗, 为了提高目的糖抗原抗体的产生, 可

收稿日期: 2004-04-18; 修回日期: 2004-06-10

基金项目: 国家高技术发展计划资助项目(2001AA624140; 2001AA628110)

作者简介: 甘丽(1976), 女, 硕士, 湖北黄冈人, 从事海洋药物研究, E-mail: ganny1@163.com

以从天然糖抗原中提取分离出目的糖抗原,然后与载体蛋白耦联制备成新的免疫复合物。如新型隐球菌荚膜多糖有-1,3连接的线形甘露糖骨架,主要成分为葡萄糖醛酸-木糖-甘露糖(glucuronoxylo-mannan, GXM),部分O-乙酰化。1992年Casadevall<sup>[10]</sup>将A型新型隐球菌荚膜多糖GXM与破伤风类毒素(tetanus toxoid)耦联制备出对应的单抗。人工免疫复合物的制备涉及到载体、耦联方法的选择。

早期有将多糖抗原与绵羊红细胞、细菌细胞制备成混悬液作为免疫原,这些颗粒性的物质可以吸附多糖,起到载体的作用<sup>[13,11]</sup>。现在常用的载体有破伤风类毒素、牛血清白蛋白、鸡卵清蛋白、人血清白蛋白、钥孔嘁血蓝素等蛋白类<sup>[10,20,12~15]</sup>。这些载体可以起到很好的增强免疫的目的。一般来说载体来源与免疫动物种属的差异越远免疫效果越好。

耦联方法的选择应注意两方面的问题,一是根据糖类物质结构特点选用不同的耦联方法和耦联剂。氨基糖可选用碳二亚胺、戊二醛<sup>[1,16]</sup>;羧基糖可用碳二亚胺、氯甲酸异丁酯法;含醛基的糖可用还原胺化法<sup>[13,14]</sup>。琥珀酸酐法、重氮化的对氨基苯甲酸法、一氯醋酸钠法、O(羧甲基)羟胺法等适用于含羟基、羧基的糖<sup>[17]</sup>,这些试剂与羟基、羧基反应后以自身的羧基与载体的氨基再用上述方法连接。过碘酸盐氧化法可以将糖的羟基氧化成醛基后再用还原胺化法耦联<sup>[18,19]</sup>。上述各种方法的原理是将带有游离氨基、羧基、醛基等的糖与载体直接耦联,没有这些基团的糖须经适当改造,使其转变为含这些基团的衍生物后,再与载体耦联,由此产生了空间臂(space arms)的概念,即耦联试剂的有无、长短、特性对耦联也有很大影响。Pawlowski等<sup>[20]</sup>讨论了空间臂的作用,他们用2-iminothiolane作为空间臂,可以将分子质量高达150ku的多糖连接到破伤风内毒素上。由此可见,如果能找到一适当的分子作为耦联多糖与蛋白间的空间臂,可以减少蛋白的空间位阻,提高耦联率,以及降低所耦联多糖的分子量的要求。二是选择区位选择性强、对糖抗原决定簇影响小的耦联方法和耦联位点。上述很多耦联方法没有区位选择性,即多糖抗原中任何位置,只要有可以反应的羧基、氨基基团就可以与载体上相应基团进行反应。而且,有些功能基团的引入,虽可以使耦联反应顺利进行,但可能会造成糖分子上抗原决定簇的改变,得到的抗体就不是针对原来的糖抗原本身,而是复合物中经过修饰的糖。从肝素单抗的研究过程可以看出人们是在不断实验的基础上逐渐认识到这点的。直到1994年,德国海德堡大学的Huhle<sup>[13,21]</sup>

等人对肝素与牛血清白蛋白的耦联方法进行了探讨,用还原胺化法制备的肝素与BSA复合物免疫Balb/c小鼠后才第一次得到针对肝素的IgG型抗体。在此之前制备的肝素抗体都不是针对肝素母链自身<sup>[13,12,14]</sup>。

所以选择对糖结构影响小的特定的耦联位点、适宜的耦联方法对制备出特异性的抗体非常关键<sup>[13,18]</sup>。大量文献报道表明,末端存在醛基的还原多糖及寡糖,用还原胺化法与载体的氨基进行耦联制备的复合物免疫动物,可以得到特异性针对目的糖抗原的抗体,而且该方法操作简便易行。作者也曾做过此方面的探讨,发现的确如此。不过有的文献认为,还原胺化法更适用于小分子量的寡糖<sup>[20]</sup>。

### 1.3 多糖模拟物抗原

根据多糖的单克隆抗体和噬菌体库,找出可以模拟多糖的多肽。模拟多糖的多肽与载体蛋白耦联制备的免疫复合物成为T细胞依赖型免疫原,能够引起更强更持久的免疫应答<sup>[22]</sup>。新近发展的DNA疫苗技术也为糖类物质免疫原的制备提供了新途径。Lesinski等<sup>[23]</sup>在合成了肺炎球菌(*Streptococcus pneumoniae*)荚膜多糖模拟物的基础上,用PCR技术克隆出表达该多肽模拟物的DNA作为免疫原,获得了很好的免疫效果。

## 2 糖类抗体检测方法的改进

细胞融合是一个随机过程,要能快速准确地从大量培养细胞中筛选出特异性针对抗原的杂交瘤细胞不是一件容易的事,工作量比较大。而且糖类抗原与常用蛋白类抗原相比,吸附性较差,给抗体检测带来很大不便。因此在进行细胞融合之前建立一种稳定灵敏的抗体检测方法显得尤其重要。

### 2.1 生物学检测方法

早期抗体检测方法主要是利用抗原抗体反应的一些特性,如利用沉淀反应的免疫双扩实验、补体结合实验、红细胞凝集实验等<sup>[11,12]</sup>。生物学检测方法简便易行,不需要特殊设备,但灵敏度较低。对糖类抗原来说,产生高滴度的抗体相对不易,所需时间较长,因此用生物学方法进行检测,可能会产生假阴性的结果;也不宜用于阳性杂交瘤细胞的筛选。

### 2.2 免疫学检测方法

荧光抗体技术、放射免疫测定、酶免疫学技术,这经典的三大免疫学技术,解决了生物学检测方法灵敏度低的问题,均可用于抗体的检测。对于其它一些新的检测方法如用高效液相、流式细胞仪检测抗体和挑

选克隆细胞株,因所需设备昂贵,应用很少。放射免疫分析方法具有对人体危害大的缺点,且需要特殊的仪器设备;而荧光免疫学方法具有本底高的缺点,且容易出现荧光猝灭的现象。所以1971年 Engvall 等建立的检测可溶性物质的酶联吸附试验(ELISA)以其微量、特异、高效、经济、方便、安全等优点,广泛应用于生物学和医学等各领域,也广泛用于单克隆抗体的检测。但糖类物质单抗用ELISA进行检测时最大困难在于糖类物质尤其是小分子量多糖不易直接吸附到常用的聚苯乙烯酶标板上,使得检测灵敏度低,结果平行性和重现性差。经过不断地尝试,不断有新方法出现,下面着重介绍一下糖类物质单抗制备过程中ELISA技术上的一些改进。

### 2.2.1 载体的改进

载体的改进大致分3种方法:载体材料的改进、载体经物理方法处理、载体经化学方法处理。

常用的各种塑料反应板都可以作为载体,不同塑料载体的吸附能力差别很大,现最常用的是聚苯乙烯板。塑料载体对蛋白的吸附作用主要是依靠疏水键、电荷间的相互作用等,对蛋白的吸附能力基本上可以满足实验要求;但对糖的吸附能力则与糖的分子量、结构、性质有很大关系。高分子量多糖、带电荷较多的多糖吸附效果相对较好。结合免疫印迹技术,发展了斑点酶联吸附实验(dot-ELISA),以硝酸纤维素膜为载体,对多糖吸附能力相对较强,可用于小批量抗体的检测, dot-ELISA 还具有包被抗原所需样品量少的优点。现在有用聚乳酸盐和聚羧基丁酸盐制备的可生物降解塑料板,其上带有羧基<sup>[24]</sup>。Tom Ewart 等用苯乙烯与马来酸酐/马来酸共聚物作为酶标板材料,直接提供了可供耦联的羧基。这些可提供特殊基团的酶标板在保存时对周围环境如湿度有一定要求,以防基团失活,以防活性基团失活。免疫微球、生物芯片的出现是结合了多种技术对载体材料的最新改进。

酶标板对多糖尤其是低分子量多糖的吸附能力较差,在酶标板上先铺一层带正电荷的L-多聚赖氨酸(分子质量150 ku)或鱼精蛋白,利用电荷间的吸附作用可以加强聚阴离子化合物糖胺聚糖的铺板效果<sup>[11,25]</sup>。在酶标板上先铺一层硅胶也可以提高灵敏度<sup>[26]</sup>。

可以根据实际需要,用不同的化学方法在酶标板上耦联不同的基团。现在已有商业的带不同基团的酶标板出售。Špoljar<sup>[27]</sup>将多糖上的羟基用溴化氰(CNBr)活化后与市售氨基化酶标板耦联进行铺板。这种氨基化板子比普通板子相比,具有孔间差异小,灵

敏度高的特点。

### 2.2.2 包被抗原的改进

糖包被抗原的改进也涉及耦联载体及耦联方法的选择两方面。耦联方法在上面已经讨论过,这里不再赘述。

糖胺聚糖如硫酸软骨素、硫酸角质素、硫酸皮肤素等多以核心蛋白聚糖作为包被抗原进行筛选,但比较被动,是在筛选出核心蛋白聚糖抗体阳性的克隆株后再找出针对核心蛋白聚糖中多糖的抗体阳性细胞株<sup>[4-7]</sup>。病原菌荚膜多糖也是如此,此外还可以用细胞直接包被进行筛选<sup>[10-14]</sup>。这种铺板方法主要用于不易得到纯化多糖的抗体的筛选;如果能得到纯化的多糖,可以将其与载体进行耦联后作为包被抗原进行直接筛选,这样受到的干扰小,工作量小,且不易产生假阳性结果。

耦联载体最好与免疫复合物中的载体不同,可以减少交叉反应;如果包被抗原复合物与免疫原复合物中的载体相同,则要采取相应措施排除假阳性结果,避免筛选出的抗体阳性细胞株是针对载体蛋白而不是目的多糖的。

早期一般采用蛋白、多肽类作为载体,且分子量一般比较大,这样吸附到酶标板上的效果才好,但这样会出现空间障碍的问题。在溶液中多糖的构象与包被在板子上的多糖构象可能并不完全一致,暴露出的抗原决定簇的大小、多少可能不同,这也许能说明为什么相同的抗体对溶液状态的多糖和包被在酶标板上的多糖结合力是不一样的<sup>[3]</sup>。因此,人们也一直不断地寻找一些更简单的铺板方法和其他有特殊性质的小分子载体物质。Jauho<sup>[28]</sup>等就曾将带羧基的细菌荚膜多糖与光催化化合物蒽醌(anthraquinone)连接后,在350 nm紫外光照射下,利用蒽醌的活性直接耦联到聚苯乙烯酶标板上。生物素-亲和素的结合常数可达 $10^{15}$  mol/L,一旦结合很难分离,经得起高度稀释,可明显降低或避免反应中可能存在的非特异性反应。ELISA中生物素-亲和素系统(avidin-biotin)的引入,不仅大大提高了酶联免疫吸附实验的灵敏度,而且也提供了另一种间接包被板子的方法。链霉抗生物素(streptavidin)为高分子量蛋白,可以直接吸附在酶标板上,将多糖与亲和素(biotin)即维生素H耦联,通过生物素-亲和素的高亲和力作用,将多糖包被在酶标板上进行多糖抗体的检测<sup>[29,30]</sup>。

### 3 海洋多糖类药物 911 的单抗

911 是从海藻中分离提取的具有特殊分子骨架的同糖化合物,后经分子修饰而成的海洋硫酸多糖,是中国海洋大学海洋药物与食品研究所开发研制出的抗艾滋病一类新药,目前已完成 期临床研究,进入 期临床研究。作为抗艾滋病药物,911 可以通过免疫调节和抑制病毒复制等多途径发挥抗艾滋病作用,有疗效确切、副作用小等优点,但由于多糖化学结构的复杂性,且没有特征的紫外吸收,所以目前缺乏一种微量定量的、特异性强的体内检测方法。911 为低分子量多糖,直接免疫动物无法诱导抗体产生,作为包被抗原直接吸附到聚苯乙烯酶标板上的效果也不太好。2003 年,该所用杂交瘤技术,以 911-牛血清白蛋白耦联物为免疫原,911-人血清白蛋白耦联物为包被抗原进行克隆筛选,成功制备了 911 的单抗<sup>[31]</sup>,并且开始用于 911 的临床药代动力学研究。实验表明,制备特异性抗体,用免疫学方法解决海洋多糖类药物的药代动力学问题是切实可行的,为海洋多糖药物的开发解决了后顾之忧。

### 4 小结

由于单克隆抗体在生物学、医学等领域应用中的实用性及可操作性,使 B 淋巴细胞杂交瘤技术成为许多实验室的常规技术。但糖类物质单抗的研究一直相对较少,主要集中在内源性多糖(糖胺聚糖)和病原微生物荚膜多糖/脂多糖,2003 年前国内则只见细菌脂多糖单抗的报道<sup>[32,33]</sup>,也未见糖类物质基因工程抗体问世。这可能与糖类化合物的研究处于起步阶段、糖类物质单抗制备技术上存在一些困难有关;也与单抗的实用性有关,即现在开发出的糖类抗原不多。除了前面提到的两类糖以外,海洋糖类物质具有很广阔的开发应用前景。海洋占地球表面的 71%,蕴藏着丰富的生物资源,根据目前资料表明,至今从海洋生物中提取的活性物质已有数千种,而糖类物质是其中的一大类。如海藻多糖、甲壳质、透明质酸、海参粘多糖、扇贝糖胺聚糖等,这些活性成分具有抗肿瘤、抗病毒、抗血栓、抗衰老、提高免疫力、滋补、保湿等多种功效。海藻多糖在医药、食品、工业等方面已有广泛应用;近年来甲壳质也相继开发出喜多安、壳糖安、第六要素等十余种保健品。相信随着糖化合物研究的深入,糖类药物尤其是海洋多糖类药物的开发,研究糖类物质单抗的人会越来越多,实验技术也将越来越成熟。

#### 参考文献:

[1] Geng MY, Saito H, Katsuki H. Effects of vitamin B<sub>6</sub> and

its related compounds on survival of cultured brain neurons [J]. *Neurosci Res*, 1995, **24**(1): 61-65.

- [2] 李睿,朱迅. 畸形糖畸化在肿瘤发生发展过程中的生物学意义[J]. 中国生物肿瘤治疗杂志, 1997, **4**(2): 143-145.
- [3] Straus A H, Travassos L R, Takahashi H K. A monoclonal antibody (ST-1) directed to the native heparin chain [J]. *Analytical Biochem*, 1992, **201**(1): 1-8.
- [4] Jenkins R B, Hall T, Dorfman A. Chondroitin 6-sulfate oligosaccharides as immunological determinants of chick proteoglycans [J]. *J Biol Chem*, 1981, **256**(16): 8 279-8 282.
- [5] Yamagata M, Kimata K, Oike K, *et al.* A monoclonal antibody that specifically recognizes a glucuronic acid 2-sulfate-containing determinant in intact chondroitin sulfate chain [J]. *J Biol Chem*, 1986, **262**(9): 4 146-4 152.
- [6] Caterson B, Christner J E, Baker J R. Identification of a monoclonal antibody that specifically recognizes corneal and skeletal keratan sulfate [J]. *J Biol Chem*, 1983, **258**(14): 8 848-8 854.
- [7] Kure S, Yoshie O. A syngeneic monoclonal antibody to murine meth-A sarcoma (Hepss-1) recognizes heparan sulfate glycosaminoglycan (HS-GAG): Cell density and transformation dependent alteration in all surface HS-GAG defined by HepSS-1 [J]. *J Immunol*, 1986, **137**: 3 900-3 908.
- [8] Borrelli S, Roggen E L, Hendriksen D, *et al.* Monoclonal antibodies against *Haemophilus* Lipopolysaccharides: clone DP8 specific for *Haemophilus ducreyi* and clone DH24 binding to Lacto-N-Netetraose [J]. *Infection and Immunity*, 1995, **63**(7): 2 665-2 673.
- [9] Kolberg J, Jones C. Monoclonal antibodies with specificities for *Streptococcus pneumoniae* group 9 capsular polysaccharides [J]. *FEMS Immunology and Medical Microbiology*, 1998, **20**(1): 249-255.
- [10] Casadevall A, Mukherjee J, Devi S J N, *et al.* Antibodies elicited by a *Cryptococcus neoformans*-tetanus toxoid Conjugate vaccine have the same specificity as those elicited in infection [J]. *J Infectious Diseases*, 1992, **165**(6): 1 086-1 093.
- [11] Eckert T F, Kozel T R. Production and characterization of monoclonal antibodies specific for *Cryptococcus neoformans* capsular polysaccharide [J]. *Infection and Immunity*, 1987, **55**(8): 1 895-1 899.
- [12] Gtel S N, Medina V M, Wessler S. Preparation and identification of a population of antibodies that recognize Carbodiimide-modified heparin [J]. *Blood*, 1985, **65**(4): 902-911.
- [13] Huhle G, Harenberg J, Malsch R, *et al.* Comparison of

- three heparin bovine serum albumin binding methods for production of antiheparin antibodies [J]. **Semin Thromb Hemost**, 1994, **20**(2) : 193-204.
- [14] Pejler G, Lindahl U, Larm O, *et al.* Monoclonal antibodies specific for oligosaccharides prepared by partial nitrous acid deamination of heparin [J]. **J Biol Chem**, 1988, **263**(11) : 5 197-5 201.
- [15] Ikeda R, Nishimura S, Nishikawa A, *et al.* Production of agglutinating monoclonal antibody against antigen 8 specific for *Cryptococcus neoformans* serotype D [J]. **Clin Diagn Lab Immunol**, 1996, **3** (1) : 89-92.
- [16] Lasson RL, Hjelte MB, Eriksson J C, *et al.* The stability of glutaraldehyde-stabilized 35-heparinized surfaces in contact with blood [J]. **Thrombos Haemostas**, 1977, **37**(2) : 262-273.
- [17] 朱立平, 陈学清. 免疫学常用实验方法[M]. 北京:人民军医出版社, 2000. 13-14.
- [18] Wessels M R, Paoletti L C, Kasper D L, *et al.* Immunogenicity in animals of a polysaccharide-protein conjugate vaccine against type III group B Streptococcus [J]. **J Clin Invest**, 1990, **86** (11) : 1 428-1 433.
- [19] Böcher M, Böldicke T, Kie M, *et al.* Synthesis of mono- and bifunctional peptide-dextran conjugates for the immobilization of peptide antigens on ELISA plates: properties and application [J]. **J Immunol Methods**, 1997, **208**(2) : 191-202.
- [20] Pawlowski A, Källenius 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** (11-12) : 1 474-1 483.
- [21] Huhle G, Harenberg J, malsch R, *et al.* Monoclonal antibodies against heparin and heparinoids [J]. **Semin Thromb Hemostas**, 1997, **23** (1) : 17-21.
- [22] Grothaus M C, Srivastava N, Smithson S L, *et al.* Selection of an immunogenic peptide mimic of the capsular polysaccharide of *Neisseria meningitidis* serogroup A using a peptide display library [J]. **Vaccine**, 2000, **18** (13) : 1 252-1 263.
- [23] Lesinski G B, Smithson S L, Srivastava N, *et al.* A DNA vaccine encoding a peptide mimic of *Streptococcus pneumoniae* serotype 4 capsular polysaccharide induces specific anti-carbohydrate antibodies in Balb/c mice [J]. **Vaccine**, 2001, **19**(13-14) : 1 717-1 726.
- [24] Niveleau A, Sage D, Reynaud C, *et al.* Covalent linking of haptens, proteins and nucleic acids to a modified polystyrene support [J]. **J Immunol Methods**, 1993, **159** (1-2) : 177-187.
- [25] Van den Born J, Van den Heuvel LPWJ, Bakker MAH, *et al.* Production and characterization of a monoclonal antibody against human glomerular heparan sulfate [J]. **Lab Invest**, 1991, **65** (3) : 287-297.
- [26] Frey W H, Schmalz J W, Perfetti PA, *et al.* Slicar-ELISA method improves detection and quantitation of minor glycolipid components in lipid mixtures and of other antigens [J]. **J Immunol Methods**, 1993, **164** (2) : 275-283.
- [27] Špoljar B H, Tomašić J. A novel ELISA for determination of polysaccharide specific immunoglobulins [J]. **Vaccine**, 2001, **19**(7-8) : 924-930.
- [28] Jauho E S, Boas U, Wiuff C, *et al.* New technology for regiospecific covalent coupling of polysaccharide antigens in ELISA for serological detection [J]. **J Immunol Methods**, 2000, **242**(1-2) : 133-143.
- [29] Inzana T J, Fenwick B. Serologic detection of *Actinobacillus pleuropneumoniae* in swine by capsular polysaccharide-biotin-streptavidin enzyme-linked immunosorbent assay [J]. **J Clin Microb**, 2001, **39** (4) : 1 279-1 282.
- [30] Unson M D, Newton G L, Arnold K F, *et al.* Improved methods for immunoassay of mycothiol [J]. **J Clin Microb**, 1999, **37** (7) : 2 153-2 157.
- [31] 陈騷, 辛现良, 耿美玉. 海洋硫酸多糖类药物聚甘古酯单克隆抗体制备及其特性研究[J]. 药学学报, 2003, **38**(1) : 23-26.
- [32] 郭永乐, 俞晓峰. 抗大肠杆菌 J5 株脂多糖小鼠 McAb 的制备及初步鉴定[J]. 单克隆抗体通讯, 1994, **10** (1) : 40-42.
- [33] 俞晓峰, 黄策. 抗细菌脂多糖核心糖脂域 McAb 免疫反应特性的研究[J]. 单克隆抗体通讯, 1995, **11** (3) : 11-16.

(本文编辑:张培新)