

树状分子在提高免疫分析性能方面的应用进展*

刘凤银 沈玉栋 孙远明** 王弘 雷红涛 杨金易 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, 广州 510642)

摘要 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监测领域占有重要地位, 已成功应用于农药、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, 如何提高小分子半抗原的免疫原性及抗体的亲和力仍然是制约该领域发展的关键技术瓶颈。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、纳米尺寸、单分散性以及表面呈现高密度功能团等众多优良的结构特性和良好的组织相容性, 在小分子免疫分析领域具有潜在的应用优势。本文主要综述了树状分子作为载体在抗体制备及免疫分析方面的应用, 重点介绍了树状分子作为载体在免疫原及包被原制备、作为免疫佐剂提高抗原免疫原性以及作为信号放大载体在提高免疫分析灵敏度等方面的研究现状, 最后对其在小分子化学性污染物免疫检测领域的应用前景进行了评述, 期望能为本领域研究人员提供借鉴。

关键词 树状分子, 抗体制备, 免疫分析, 应用

学科分类号 R155.5

DOI: 10.3724/SP.J.1206.2013.00399

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监测领域占有重要地位, 已成功应用于农药、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^[1-3]。但是, 许多化合物由于分子质量小、结构简单, 即使与载体蛋白偶联后也无法刺激动物免疫应答产生特异性抗体, 限制了免疫分析技术在食品安全检测中的应用。如何提高小分子半抗原的免疫原性及抗体的亲和力已经成为该领域急需解决的技术瓶颈。

树状分子(dendrimers)是一类具有树枝状结构的大分子^[4], 于1979年由Tomalia首次提出并合成^[5]。树状分子一般由内核、分支单元和表面官能团三部分构成(图1), 这三部分可以由同一种化合物构成, 如只由赖氨酸组成的聚赖氨酸树状分子, 也可以根据各个化合物的结构反应特性以及不同的研究需要选用一种或多种不同的化合物构成树状分子的内核和分支单元, 同时可以选用不同功能基团的化合物对树状分子做分子表面修饰, 使其具有不同的表面官能团, 如 $-NH_2$, $-COOH$, $-SH$ 等, 满足不同研究的需要。树状分子介于其分子的特殊构造以及特殊的合成方法(发散合成法和收敛合成

法), 具有分子组成明确、结构规整、高度支化、纳米尺寸、单分散性以及表面呈现高密度官能团的特性^[6]。基于上述多种优良特性, 树状分子已经被成功应用于多个方面, 如在生物医学上作为药物和

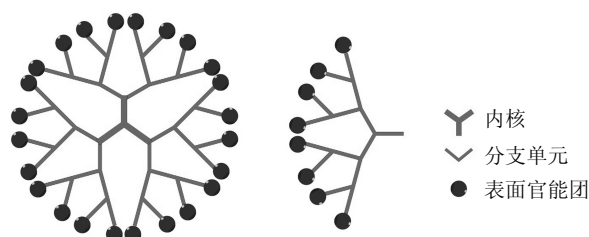


Fig. 1 Basic structure of Dendrimers

图1 树状分子基本构成

* 国家自然科学基金(31271865, 31301467), 国家重点基础研究发展计划(973)(2012CB720803)和广东省自然科学基金(S2012040008046)资助项目。

** 通讯联系人。

孙远明. Tel: 13922770369, E-mail: ymsun@scau.edu.cn

徐振林. Tel: 13570552215, E-mail: xzlin@scau.edu.cn

收稿日期: 2013-09-06, 接受日期: 2014-01-22

基因载体^[7-10]、作为核磁共振(MRI)造影剂^[11-12]、作为硼中子俘获治疗试剂治疗癌症^[13]、作为生物传感器芯片材料^[14-15]、作为抑菌剂^[16-17]等。

近年来研究发现,将多肽片段连接到以赖氨酸为基础单元的聚赖氨酸树状分子得到的多抗原肽(MAP)由于具有密集的抗原决定簇,可以增加与免疫细胞表面受体的结合能力,增强免疫原性、抗体产生能力以及抗体亲和力,在制备小分子肽抗体方面有很大的优势^[18-21]。因此,本文就树状分子在抗体制备及免疫分析方面的应用进行综述,重点介绍了树状分子作为载体在免疫原及包被原制备、作为免疫佐剂提高抗原免疫原性以及作为信号放大载体在提高免疫分析灵敏度等方面的研究现状,旨在找寻提高小分子半抗原免疫原性及抗体亲和力的方法,扩大免疫分析方法在食品安全监察领域的应用范围。希望本文能够为对抗体制备有兴趣的研究者提供一些参考。

1 树状分子作为载体在免疫原上的应用

为了诱导动物免疫反应,一些传统的小分子半抗原或抗原肽需要与载体蛋白偶联或者形成多聚体来增强其免疫原性^[22-23]。但这类免疫原抗原决定簇密度低,而且载体蛋白的存在会引起动物产生针对载体蛋白的免疫应答,使得所制备的抗体产生非特异性吸附而影响免疫分析。相比之下,树状抗原可以很好地克服这一缺点^[24-26]。树状分子作为载体蛋白替代物具有如下几方面优势。

1.1 增大半抗原密度,增强抗原的免疫原性

介于特殊的分子结构,树状分子表面通常呈现出密集的官能团。由分子内核出发,分支单元有序叠加在分子表面,随着树状分子代数的增长,其表面官能团数量呈指数增长。研究表明,当树状分子代数超过3代时,其表面密集的官能团能够使得分子内部形成一种空腔^[6,27]。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,增大了半抗原的密度^[24]。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^[6,28-29]。2007年,Amexis和Young^[30]利用四价聚赖氨酸(分子分支末端具有4个活性氨基),将登革热2型病毒(dengue-2 virus, DEN-2)中氨基酸序列为352~368的抗原肽连接到聚赖氨酸四个分支上制成四价多抗原肽,免疫动物。相比以匙孔血蓝蛋白(KLH)为载体蛋白的抗原,该策略成功将抗体的效价水平提高了一个数量级。当然,并不是树状

分子的代数越高、半抗原密度越大、免疫效果越好,因为半抗原的密度过高可能会导致免疫耐受,从而导致了免疫效果的下降^[29,31]。目前应用于多肽类抗体制备的树状分子多为四分支或八分支的聚赖氨酸,也有研究者尝试采用一些更高分支的聚赖氨酸分子或其他一些非氨基酸组分的树状分子如聚酰胺-胺(PAMAM)等,但效果并不理想,未能明显提高抗体的质量,因而目前用于抗体制备的树状分子多为一些低分支的聚赖氨酸类^[6,20,29]。这其中可能存在的原因就是半抗原的密度过高,导致了机体的免疫耐受。另外有研究者尝试在树状分子结构上同时连接B、T两种细胞表位,以期更好地提高其免疫原性。1989年,Tam和Lu^[32]的研究证实在免疫原的化学结构中同时存在B和T细胞表位,能够增强机体的免疫反应,获得功能更强的抗体。之后,他们选取龋齿动物原虫的CS蛋白中两种分别是其B细胞和T细胞表位的抗原肽,制备了10种具有不同表位数目或不同排列方式的MAP,免疫动物。结果表明,将两种表位串联排列,有效地增强了免疫原的免疫原性,提高了抗体的效价(图2)^[33]。此后,McClean等^[34]的研究也证实了此观点。Bainbridge^[35]和Ali等^[36]的研究表明,该策略同时还能够提高抗体的亲和力和加强体液及黏膜的免疫反应。同时,2012年,Li等^[37]的研究报道表明,将B细胞表位与辅助性T细胞表位合适地排列与组合,能够刺激机体产生高水平的中和抗体。

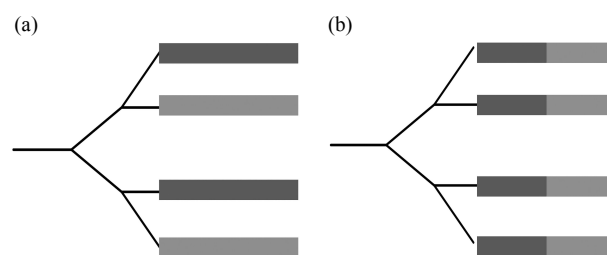


Fig. 2 Biepitope MAP

图2 双表位多抗原肽

(a) 分表位并联 MAP₄. (b) 双表位串联 MAP₄.

1.2 无免疫原性,可提高抗体的特异性

传统的载体蛋白如 KLH、牛血清白蛋白(BSA)、卵清蛋白(OVA)等本身有着较强的免疫原性,能够刺激机体的免疫系统产生较强的免疫应答,且其本身具有众多的抗原决定簇,因此以这些蛋白质为载体制备的抗原刺激机体产生抗体大多是针对载体蛋

白本身, 而非针对小分子半抗原的目的抗体. 目前关于树状分子本身固有免疫原性的研究表明, PAMAM 有一定的免疫原性, 能够刺激机体产生相应的抗体, 但是其他一些由氨基酸组成的树状多肽(如聚赖氨酸)则表现出无免疫原性^[38-40]. 这一特性也是树状分子能够替代载体蛋白作为半抗原载体的前提^[17]. 2010年, Romestand 等^[41]用三代聚赖氨酸(G3、115个赖氨酸、123个末端活性氨基)免疫兔子, 无相应抗体产生, 表明其无免疫原性. 他们又在 G3 的氨基表面偶联组胺分子(图 3), 对经过 BSA-组胺(BSA 为载体蛋白)首次免疫后的兔子进行再次免疫, 结果表明, 相比于只用 BSA-组胺免疫得到的抗体, 用经聚赖氨酸抗原免疫得到的抗体特异性显著提高. 2009年, Aguilar 等^[42]利用固相合成技术, 将大鼠的 GH-BP 的 4 个 C 端多肽片段(GH-BP263~279)共价结合到四价聚赖氨酸分子上, 制备了 GH-BP MAP₄. 通过动物免疫获得兔抗鼠 GH-BP 的多克隆抗体, 该抗体能够特异性识别大鼠和小鼠的 GH-BPs, 而不能识别 GH-Rs. 该策略将多肽片段与树状分子连接, 成功消除了常用载体蛋白高免疫原性的弊端, 同时增大了半抗原密度, 增强了抗原的免疫原性, 提高了抗体的亲和力. 作为传统载体蛋白的替代物, 一般要求树状分子的分子质量越高越好, 通常 >10 ku 分子质量才有载体蛋白的作用, 目前大部分研究都采用 3 代及以上的树状分子作为载体蛋白替代物, 分子质量约在 40 ku 左右^[17].

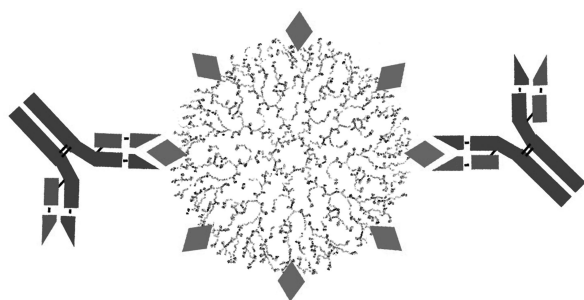


Fig. 3 Highly specific antibody preparation *in vivo*

图 3 生物体内高特异性抗体制备

1.3 连接不同抗原表位, 制备双(多)特异性抗体

借助分子表面众多的官能团, 树状分子可以同时偶联多个半抗原或多肽片段, 同时如果在偶联过程中进行有效控制, 就能够达到在树状分子末端偶

联两种或者多种不同的抗原表位的目的. 通过控制各个抗原表位之间以及与树状分子之间的比例, 偶联的先后顺序, 可以较好地实现各个抗原表位以相同或不同的偶联比与树状分子偶联, 为制备能够识别两种或多种不同抗原决定簇的双(多)特异性抗体提供前提. 1989年, Tam 和 Lu^[22]利用八分支的聚赖氨酸分子合成了具有多抗原决定簇的 MAP, 该 MAP 分子同时具有代表 HBV 病毒中 S 和 S(2)蛋白片段的独立抗原决定簇, 结果获得了能够同时识别 S 和 S(2)的双特异性抗体(图 4). 2003年, Haro 等^[43]利用聚赖氨酸, 将甲肝病毒 HAV 的 2 个抗原多肽 VP1 和 VP3 等比连接到各分支末端, 制成四价并联双表位树状多肽抗原, 再以脂质体为载体, 免疫兔子, 最终获得了可同时识别 VP1 和 VP3 的 IgG 抗体. 该目标的实现, 将有可能制备功能更强大的抗体分子, 这对抗体在各方面的良好应用提供重要支撑作用.

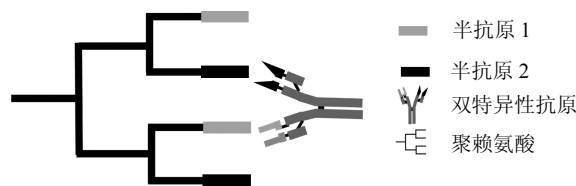


Fig. 4 Bispecific antibody preparation

图 4 双特异性抗体制备

此外, 有研究者尝试将偶联有多肽的 MAP 与其他载体蛋白相连. 2001年, Cruz 等将 HIV-1 的多抗原肽 JY1 制备成 JY1-MAP4 或其二聚体 JY1-MAP8 结构, 并通过琥珀酸酐与载体蛋白 HBsAg(乙型肝炎病毒表面抗原)偶联, 得到 HBsAg-JY1 MAP4 和 HBsAg-JY1 MAP8, 免疫 Balb/c 小鼠. ELISA 实验数据表明, HBsAg-JY1 MAP8 得到的抗体抗 JY1 效果最好, HBsAg-JY1 MAP4 与 JY1-MAP8 效果相当^[44-45]. 这说明载体蛋白 HBsAg 的存在提高了抗体产生的质量. 之后, 他们的研究团队优化了 HBsAg-JY1-MAP8 的结构, 在结构内部嵌入 4 个破伤风病毒 T 细胞表位, 成功地提高了抗体的宽谱性, 很好地解决了 HIV 病毒高变异性导致的准确性问题, 但免疫原的免疫原性没有提高. 抗体宽谱性提高的原因, 可能是由于载体蛋白的存在激活了 T 细胞, 使其快速参与

到免疫反应中来，也可能是增大了抗原多肽的密度所导致。相反，2013年 Suarez-Pantaleon 等^[46]的研究表明，该策略能够提高抗体的特异性，即能特异性识别结构相似的多肽片段(图 5)。

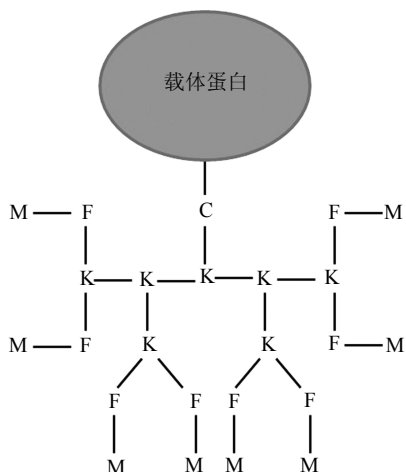


Fig. 5 Immunogen preparation: MAP coupled with carrier protein^[46]

图 5 MAP载体蛋白偶联制备免疫原^[46]

树状分子替代载体蛋白作为半抗原载体，能够显著地改善免疫效果，增强免疫强度，提高抗体特异性，除了上述因素外，也可能是由于树状分子能够将半抗原密集地呈现在分子表面，这方便抗原呈递细胞 APCs 将其更好地处理并呈递予免疫细胞，有助于产生更快、更强的免疫反应^[47-49]。同时，有报道称，树状分子替代载体蛋白偶联半抗原能够延

长免疫反应持续的时间^[50]。

2 树状分子在免疫佐剂上的应用

为了取得更好的免疫效果，免疫原往往需要与免疫佐剂混合。大多数佐剂结构复杂，为一些表面活性物质、微生物成分、各种聚合物和(或)脂类的混合物，具有不确定性，不可用于人类使用。有研究表明，树状分子具有类似免疫佐剂的作用。树状分子作为一类高分支化的分子，具有结构简单规范、组成确定和安全无毒副作用的优点。其作为免疫佐剂主要体现在以下两方面：a. 树状分子作为载体，含有内置佐剂；b. 树状分子作为独立的佐剂分子。

2.1 内置佐剂的树状分子

所谓的内置佐剂，往往是一些脂类物质，起到免疫辅助作用(图 6)。1996年，Tam^[51]首次将一个三棕榈酰甘油酯结构通过丝氨酸连接臂连接到 MAP 分子结构中，形成一个内置佐剂。该 MAP 为四分支聚赖氨酸分子，同时连接有 4 个 HIV 多肽抗原。在不添加其他外来佐剂的情况下进行动物免疫，最终获得了针对 HIV 的抗体。随后 Toth 等^[52]设计了一种 LCP(lipid core peptide)载体，即在聚赖氨酸分子的羧基端连接一个脂质氨基酸基团。Olive 等^[53]利用此类 LCP 等比连接链球菌膜蛋白(GAS)的 2 个不同抗原多肽，制成内置佐剂的四价并联双表位多抗原肽 LCP-GAS，分别在不添加佐剂和添加弗氏佐剂两种条件下进行动物免疫，均产生了高强度免疫反应并且抗体效价水平相当。

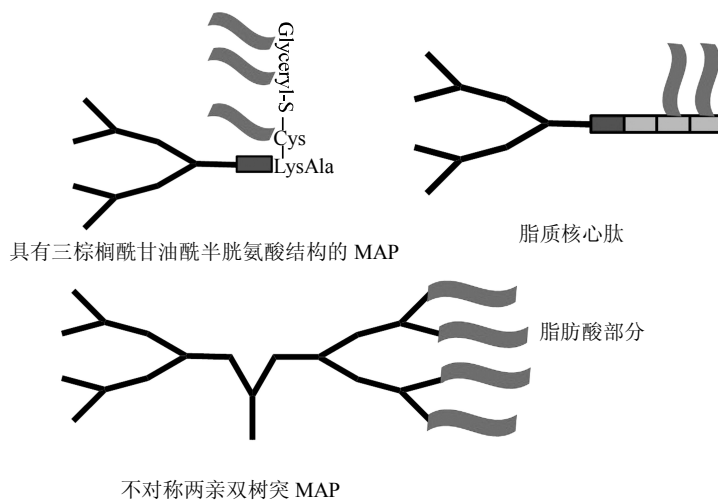


Fig. 6 Examples of published self-contained adjuvant MAP structures

图 6 报道的几种内置佐剂 MAP 结构

脂质化的树状分子能够起到佐剂的作用, 主要归功于其脂质部分. 脂类能够促进抗原分子与抗原呈递细胞(APCs)膜物质的相互作用, 从而将表面抗原肽暴露于 APCs, 使其更容易被 APCs 摄取、加工和呈递, 从而更好地刺激 B、T 淋巴细胞, 产生免疫反应^[22, 51, 54-56].

2.2 树状分子作独立佐剂

除了结构上连接一些脂类等强化免疫反应的结构达到佐剂效果外, 树状分子本身亦可单独作为佐剂使用. 研究表明树状分子无免疫原性^[41, 57], 能够作为佐剂使用可能是因为其能够激活 T 细胞. 2000 年, Olszewska 等^[58]在 8 分支聚赖氨酸分子上连接 8 个来自麻疹病毒融合蛋白 MVF 的 B 细胞表位 M2, 制备了免疫原 MAP-M2, 通过动物免疫获得了高效价、高亲和力的抗 M2 血清. 其中淋巴细胞增殖数据表明, MAP-M2 产生的免疫反应中 T 细胞被激活, 而 MAP-M2 本身不含有 T 细胞表位, 这表明聚赖氨酸本身能够激活 T 细胞, 使其快速参与免疫反应. 也有研究者称 MAP 分子能够克服 MHC 限制^[59]. 1998 年, Wright^[60]将聚酰胺-胺树状分子(PAMAM)与流感抗原混合进行小鼠免疫, 很好地体现了 PAMAM 的佐剂特性. 他们分别测定了 PAMAM G1、G3 和 G6 的佐剂活性, G1 没有抗体产生, G3, G6 均在低浓度(流感抗原与 PAMAM 的摩尔比为 1:100)下呈现出了良好的佐剂特性, 并且活性与其所含有的氨基数目呈正相关. 其中 PAMAM G6 作为佐剂, 相比 PBS 体系而言, 二次免疫后抗体效价水平提高了 100 多倍. 之后有研究者尝试将 PAMAM 作为佐剂用于 DNA 疫苗中. Audonnet 等^[61]将一种热裂缝性 PAMAM (heat-fractured PAMAM dendrimer)作为佐剂与 DNA 质粒混合进行动物免疫, 但文献中没有给出实验相关数据. 2012 年, Shukla 等^[62]采用六价的咪唑啉树状分子作为免疫佐剂, 制备了高质量的兔抗牛乳白蛋白(bovine a-actalbumin)抗体. 咪唑啉单体是 toll 样受体(toll-like receptors, TLRs)TLR7 受体的激活剂, 能够联系先天性免疫和获得性免疫, 促使免疫系统产生更快、更强的免疫反应. 他们在含有反应活性基团的树状基质上连接 6 个咪唑啉制备六价的咪唑啉树状分子作为免疫佐剂, 与牛乳白蛋白一起免疫兔子. 相比以咪唑啉单体做佐剂, 树状的咪唑啉增强了抗体产生能力及抗体亲和力.

3 树状分子在提高免疫分析灵敏度中的应用

3.1 树状分子作为包被原载体提高免疫分析灵敏度

免疫检验中经常需要将检测的小肽片段有效结合在固相表面, 而其本身结合能力不强, 往往导致检测灵敏度低^[63-65]. 有研究者表明, 相对线性多肽, 多抗原肽结构能够显著提高多肽检测试验的灵敏度^[66-69]. 2004 年, Ndongmo 等^[69]利用多抗原肽 MAP 提高了猿免疫缺陷病毒 SIV 检测的灵敏度和特异性. 他们将 SIV 多肽片段连接到四分支聚赖氨酸分子上, 制得四价 MAP4 作包被原用于酶免疫测定(EIA)中. 该策略成功克服了用 HIV 抗原检测抗 SIV 抗体检测方案导致的灵敏度不足, 以及不能对未知基因序列的 SIVs 做出准确判断. 同时, 相对于线性多肽, MAPs 与固相表面的相互作用力增强, 提高了分析的灵敏度. 2010 年, Gomara 等^[69]用类似的检测方案提高了血清中抗庚型肝炎病毒(GBV-C)抗体的检测灵敏度. 他们选取该病毒的结构蛋白 E2 和非结构蛋白 NS5a 中的多肽片段 E2 (99~118)和 NS5a(112~126)等比并联在四价的聚赖氨酸分子上制备多抗原肽 MAP4, 相比线性多肽单体直接包板, ELISA 检测抗体的灵敏度和特异性得以有效提高. 而若小分子化合物作为检测的目标物分子, 传统做法是将其与载体蛋白质或脂类物质偶联制得包被原^[59, 66, 70], 利用蛋白质、脂类与固相表面的疏水作用, 将其包被在固相表面, 但这往往会存在非特异性吸附^[71-73]. 同时, 由于该类偶联反应不可控制因素很多, 再现性差, 不利于实验标准化方法的建立^[69, 74]. 树状分子无免疫原性, 在偶联反应中能够保持稳定的结构和良好的水溶性, 同时与固相表面的易结合性和易检测性, 使其能够有效替代包被原载体, 提高免疫检验的灵敏度^[75-77]. 2013 年, Zhou 等^[70]以聚赖氨酸代替 OVA 作为包被原载体, 建立了一种检测双酚 A(BPA)的间接竞争 ELISA 方法. 该方案成功提高了检测的灵敏度, IC_{50} 相比降低了近 90%.

3.2 树状分子作为信号放大载体提高免疫分析灵敏度

电化学免疫传感器将免疫分析和电化学传感器技术相结合, 具有体积小、选择性和灵敏度高、响应时间短、所需样品少等优点, 在医药工业、环境监测和食品安全检测等诸多领域有着广阔的应用前

景。而将纳米技术与电化学免疫分析技术相结合, 开发基于纳米材料的新型免疫传感器, 对传感器检测性能和检测灵敏度的提高、检测时间的缩短、高通量实时分析检测的实现具有重要意义^[78-82]。具有纳米尺寸的树状分子, 兼具分子组成明确、结构规整众多优良特性, 同时其表面分布的大量官能团方便进一步与其他化合物结合, 使其成为该种应用的不二之选^[83-87]。2012年, Ruiz-Sanchez等^[88]将PAMAM作为生物传感器芯片元件的固相表面修饰材料, 建立了一种有效检测青霉素过敏患者血清中抗青霉素抗体IgM的放射免疫方法(RIA)(图7)。他们对纤维素、沸石表面进行表面修饰, 利用PAMAM表面分布的大量氨基活性基团提高青霉素半抗原(BPO)的结合数量, 提高了检测的特异性与灵敏度。树状分子的引入克服了沸石表面材料存在的非特异性吸附以及纤维素表面官能团数量少、实验重复性差的弊端, 同时该策略为其他生物性分子的定量检测提供了思路。

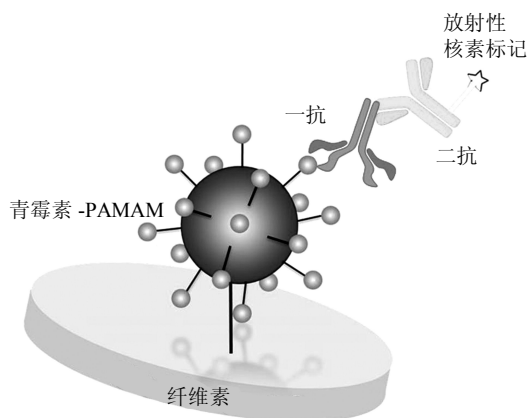


Fig. 7 The surface modification of immune sensor solid phase with dendrimers

图7 免疫传感器固相表面采用树状分子修饰

4 展 望

树状分子除了具有一系列优良的结构特性外, 还具有很多良好的生物学特性, 如良好的组织相容性、无免疫原性、耐生物降解等, 这些良好的特性使得其能够在很多方面得以有效应用。虽然树状分子在抗体制备方面已有很多有效应用的例子, 但大多集中在MAP疫苗制备方面的应用, 在制备针对一些小分子化合物抗体方面的应用比较少, 而这在对该类小分子化合物的有效检测具有重大意义。同

时, 树状分子能够增强免疫强度、提高抗体质量的确切机理还不够清楚, 现今大量的研究还停留在根据抗体对抗原的检测效果来进行推测, 研究者应该加强其在抗原抗体识别机制方面的研究, 建立构效关系模型, 从动力学和分子水平上真正掌握其作用机理。树状分子在免疫分析方面的应用, 尤其在免疫传感器上的应用, 树状分子能够直接结合到传感器芯片上, 提高了传感器的检测性能, 大大促进了免疫分析的发展。总之, 目前将树状分子应用于小分子化学污染物免疫分析方法研究尚很少, 但是鉴于其在疫苗领域应用取得的成果, 未来将树状分子应用于提高小分子半抗原免疫原性、提高抗体的特异性和分析方法的灵敏度等方面具有较广阔的前景, 值得进行深入的系统研究。

参 考 文 献

- [1] Lee N A, Kennedy R. Immuno-analytical techniques in the monitoring of contaminants in food and environment. *JITV*, 2012, **17**(4): 37-46
- [2] Meng M, Xi R. Review: current development of immunoassay for analyzing veterinary drug residue in foods and food products. *Anal Lett*, 2011, **44**(15): 2543-2558
- [3] Xu Z L, Sun W J, Yang J Y, *et al.* Development of a solid-phase extraction coupling chemiluminescent enzyme immunoassay for determination of organophosphorus pesticides in environmental water samples. *J Agric Food Chem*, 2012, **60**(9): 2069-2075
- [4] Steffensen M B. Methods for the syntheses of compositionally diverse dendrimers. Texas: Texas A&M University Publisher, 2004
- [5] Šebestík J, Reiniš M, Ježek J. Dendrimers in Catalysis [M]// Biomedical Applications of Peptide-, Glyco- and Glycopeptide Dendrimers, and Analogous Dendrimeric Structures. Springer Vienna, 2012: 99-102
- [6] Tang S, Tomalia D A, Orr B G, *et al.* Regio-specific size, shape and surface chemistry designed dendrimers based on differentiated dendroid templates. *New J Chem*, 2013, **37**: 690-700
- [7] Liu K C, Yeo Y. Zwitterionic chitosan-polyamidoamine dendrimer complex nanoparticles as a pH-sensitive drug carrier. *Mol Pharma*, 2013, **10**(5): 1695-1704
- [8] Ma X, Zhou Z, Jin E, *et al.* Facile synthesis of polyester dendrimers as drug delivery carriers. *Macromolecules*, 2013, **46**(1): 37-42
- [9] Ma N, Ma C, Deng Y, *et al.* Advances in applications of dendritic compounds. *J Nanosci Nanotechnol*, 2013, **19**(1): 33-39
- [10] Patri A K, Simanek E. Biological applications of dendrimers. *Mol Pharma*, 2012, **9**(3): 341-341
- [11] Liang G, Cao L, Chen H, *et al.* Ultrasmall gadolinium hydrated carbonate nanoparticle: an advanced T-1 MRI contrast agent with large longitudinal relaxivity. *J Mater Chem B*, 2013, **1**(5): 629-638
- [12] Wen S H, Li K G, Cai H D, *et al.* Multifunctional dendrimer-entrapped gold nanoparticles for dual mode CT/MR imaging applications. *Biomaterials*, 2013, **34**(5): 1570-1580

- [13] Shukla S, Wu G, Chatterjee M, *et al.* Synthesis and biological evaluation of folate receptor-targeted boronated PAMAM dendrimers as potential agents for neutron capture therapy. *Bioconjugate Chemistry*, 2003, **14**(1): 158–167
- [14] Ogiso M, Kobayashi J, Imai T, *et al.* Carbohydrate immobilized on a dendrimer-coated colloidal gold surface for fabrication of a lectin-sensing device based on localized surface plasmon resonance spectroscopy. *Biosen Bioelectron*, 2013, **41**(15): 465–470
- [15] Karadag M, Geyik C, Demirkol D O, *et al.* Modified gold surfaces by 6- (ferrocenyl)hexanethiol/dendrimer/gold nanoparticles as a platform for the mediated biosensing applications. *Materials Science & Engineering c-materials for Biological Applications*, 2013, **33**(2): 634–640
- [16] Xue X, Chen X, Mao X, *et al.* Amino-terminated generation 2 poly (amidoamine) dendrimer as a potential broad-spectrum nonresistance-inducing antibacterial agent. *AAPS J*, 2013, **15** (1): 132–142
- [17] Charles S, Vasanthan N, Kwon D, *et al.* Surface modification of poly (amidoamine) (PAMAM) dendrimer as antimicrobial agents. *Tetrahedron Letters*, 2012, **53**(49): 6670–6675
- [18] Westerlind U. Synthetic glycopeptides in vaccine development and antibody epitope mapping. *Carbohydrate Chemistry*, 2012, **38**: 61–74
- [19] Monsoó M, De la Torre B G, Blanco E, *et al.* Influence of conjugation chemistry and B epitope orientation on the immune response of branched peptide antigens. *Bioconjugate Chemistry*, 2013, **24**(4): 578–585
- [20] Gaidzik N, Westerlind U, Kunz H. The development of synthetic antitumour vaccines from mucin glycopeptide antigens. *Chem Soc Rev*, 2013, **42**(10): 4421–4442
- [21] Fernández L, Chan W C, Egido M, *et al.* Synthetic peptides derived from an N-terminal domain/l of the E2 protein of GB virus C in the study of GBV-C/HIV-1 co-infection. *J Pep Sci*, 2012, **18**(5): 326–335
- [22] Heegaard P, Boas U, Sorensen N S. Dendrimers for vaccine and immunostimulatory uses. *Bioconjugate Chemistry*, 2010, **21** (3): 405–418
- [23] Patterson L J, Robey F, Muck A, *et al.* A conformational C4 peptide polymer vaccine coupled with live recombinant vector priming is immunogenic but does not protect against rectal SIV challenge. *AIDS Res Hum Retroviruses*, 2001, **17**(9): 837–849
- [24] 何 骏, 麻远赵, 玉 芬. 树状多肽的合成及应用. *化学进展*, 2005, **17**(3): 468–476
He J, Ma Y Z, Yu F. *Prog Chem*, 2005, **17**(3): 468–476
- [25] Holm A, Wu W, Lund-Johansen F. Antibody array analysis of labelled proteomes: how should we control specificity?. *New Biotechnol*, 2012, **29**(5): 578–585
- [26] Chang T, Alexopoulos H, Pettingill P, *et al.* Immunization against GAD induces antibody binding to GAD-independent antigens and brainstem GABAergic neuronal loss. *PLOS ONE*, 2013, **8** (9): e72921
- [27] Tomalia D A, Christensen J B, Christensen J B, *et al.* Dendrimers, Dendrons, and Dendritic Polymers: Discovery, Applications, and the Future. Cambridge University Press, 2012
- [28] Pan M, Kong L, Liu B, *et al.* Production of multi-walled carbon nanotube/poly (aminoamide) dendrimer hybrid and its application to piezoelectric immunosensing for metolcarb. *Sensors and Actuators B: Chemical*, 2013, **188**: 949–956
- [29] Tam J P. Synthetic peptide vaccine design: synthesis and properties of a high-density multiple antigenic peptide system. *Proc Natl Acad Sci USA*, 1988, **85**(15): 5409–5413
- [30] Amexis G, Young N S. Multiple antigenic peptides as vaccine platform for the induction of humoral responses against dengue-2 virus. *Viral Immunology*, 2007, **20**(4): 657–663
- [31] Liu W L, Chen Y H. High epitope density in a single protein molecule significantly enhances antigenicity as well as immunogenicity: a novel strategy for modern vaccine development and a preliminary investigation about B cell discrimination of monomeric proteins. *Eur J Immunol*, 2005, **35**(2): 505–514
- [32] Tam J P, Lu Y A. Vaccine engineering: enhancement of immunogenicity of synthetic peptide vaccines related to hepatitis in chemically defined models consisting of T- and B-cell epitopes. *Proc Natl Acad Sci USA*, 1989, **86**(23): 9084–9088
- [33] Tam J P, Clavijo P, Lu Y A, *et al.* Incorporation of T and B epitopes of the circumsporozoite protein in a chemically defined synthetic vaccine against malaria. *J Exper Med*, 1990, **171**(1): 299–306
- [34] Mclean G W, Cross A M, Munns M S, *et al.* Rapid attachment of a helper T cell epitope to branched peptides by fragment condensation to give enhanced immunogenicity. *J Immunol Methods*, 1992, **155**(1): 113–120
- [35] Bainbridge J, Jones N, Walker B. Multiple antigenic peptides facilitate generation of anti-prion antibodies. *Clin Exper Immunol*, 2004, **137**(2): 298–304
- [36] Ali R, Kumar S, Naqvi R A, *et al.* Multiple antigen peptide consisting of B- and T-cell epitopes of F1 antigen of *Y. pestis* showed enhanced humoral and mucosal immune response in different strains of mice. *Int Immunopharmacol*, 2013, **15**(1): 97–105
- [37] Li G X, Zhou Y J, Yu H, *et al.* A novel dendrimeric peptide induces high level neutralizing antibodies against classical swine fever virus in rabbits. *Veter Microbiol*, 2012, **156**(1): 200–204
- [38] Roberts J C, Bhalgat M K, Zera R T. Preliminary biological evaluation of polyamidoamine (PAMAM) Starburst™ dendrimers. *J Biomed Mat Res*, 1996, **30**(1): 53–65
- [39] Lee S C, Parthasarathy R, Duffin T D, *et al.* Recognition properties of antibodies to PAMAM dendrimers and their use in immune detection of dendrimers. *Biomed Microdev*, 2001, **3**(1): 53–59
- [40] Shi Z, Zhou C, Liu Z, *et al.* Amino acid-based dendrimers. *ChemInform*, 2012, **43**(22): 491–517
- [41] Romestand B, Rolland J L, Commeyras A, *et al.* Dendrigraft poly-L-lysine: a non-immunogenic synthetic carrier for antibody production. *Biomacromolecules*, 2010, **11**(5): 1169–1173
- [42] Aguilar R M, Talamantes F J, Bustamante J J, *et al.* MAP dendrimer elicits antibodies for detecting rat and mouse

- GH-binding proteins. *J Pep Sci*, 2009, **15**(2): 78–88
- [43] Haro I, Perez S, Garcia M, *et al.* Liposome entrapment and immunogenic studies of a synthetic lipophilic multiple antigenic peptide bearing VP1 and VP3 domains of the hepatitis A virus: a robust method for vaccine design. *Febs Letters*, 2003, **540**(1–3): 133–140
- [44] Cruz L J, Iglesias E, Aguilar J C, *et al.* Study of different coupling agents in the conjugation of a V3-based synthetic MAP to carrier proteins. *J Pep Sci*, 2001, **7**(9): 511–518
- [45] Iglesias E, Aguilar J C, Cruz L J, *et al.* Broader cross-reactivity after conjugation of V3 based multiple antigen peptides to HBsAg. *Mol Immunol*, 2005, **42**(1): 99–104
- [46] Suarez-Pantaleon C, Huet A C, Kavanagh O, *et al.* Production of polyclonal antibodies directed to recombinant methionyl bovine somatotropin. *Analy Chim Acta*, 2013, **761**: 186–193
- [47] Singh P, Moll F R, Lin S H, *et al.* Starburst dendrimers: enhanced performance and flexibility for immunoassays. *Starbu Clin Chem*, 1994, **40**(9): 1845–1849
- [48] Tarallo R, Carberry T P, Falanga A, *et al.* Dendrimers functionalized with membrane-interacting peptides for viral inhibition. *Int J Nanomed*, 2013, **8**(1): 521–534
- [49] Joshi V G, Dighe V D, Thakuria D, *et al.* Multiple antigenic peptide (MAP): a synthetic peptide dendrimer for diagnostic, antiviral and vaccine strategies for emerging and re-emerging viral diseases. *Ind J Virol*, 2013, **24**(3): 312–320
- [50] Wang C Y, Looney D J, Li M L, *et al.* Long-term high-titer neutralizing activity induced by octameric synthetic HIV-1 antigen. *Science (New York, N.Y.)*, 1991, **254**(5029): 285–288
- [51] Tam J P. Multiple antigen peptide system having adjuvant properties, vaccines prepared therefrom and methods of use thereof: USA, US, 5580563. 1996-12-03
- [52] Toth I, Flinn N, Brown F, *et al.* A novel tool in immunology: the lipid-core-peptide (LCP) adjuvant/carrier system. *Pharmaceutical Research (New York)*, 1996, **13**(9 Suppl): S86
- [53] Olive C, Batzloff M, Horvath A, *et al.* Potential of lipid core peptide technology as a novel self-adjuvanting vaccine delivery system for multiple different synthetic peptide immunogens. *Infect Immun*, 2003, **71**(5): 2373–2383
- [54] Wrobel D, Klys A, Ionov M, *et al.* Cationic carbosilane dendrimers-lipid membrane interactions. *Chem Phys Lip*, 2012, **165**(4): 401–407
- [55] Boni A, Albertazzi L, Innocenti C, *et al.* Water dispersal and functionalization of hydrophobic Iron Oxide nanoparticles with lipid-modified poly (amidoamine) dendrimers. *Langmuir*, 2013, **29**(35): 10973–10979
- [56] Svenson S, Tomalia D A. Dendrimers in biomedical applications—reflections on the field. *Advanced Drug Delivery Reviews*, 2012, **64**(Suppl): 105–115
- [57] Niederhafner P, Sebestik J, Jezek J. Glycopeptide dendrimers. Part II. *J Pep Sci*, 2008, **14**(1): 44–65
- [58] Olszewska W, Obeid O E, Steward M W. Protection against measles virus-induced encephalitis by anti-mimotope antibodies: the role of antibody affinity. *Virology*, 2000, **272**(1): 98–105
- [59] Tam J P. Recent advances in multiple antigen peptides. *J Immunol Methods*, 1996, **196**(1): 17–32
- [60] Wright D C. Adjuvant properties of poly (amidoamine) dendrimers: US, 5795582. 1998-08-18
- [61] Audonnet J F, Fischer L B, Barzu-Le-Roux S. DNA vaccines for farm animals, in particular bovines and porcines: US, 07078388. 2005-02-08
- [62] Shukla N M, Salunke D B, Balakrishna R, *et al.* Potent adjuvanticity of a pure TLR7-agonistic imidazoquinoline dendrimers. *PloS one*, 2012, **7**(8): e43612
- [63] Ahuka-Mundeke S, Ayouba A, Mbala-Kingebeni P, *et al.* Novel multiplexed HIV/simian immunodeficiency virus antibody detection assay. *Emerging Infectious Diseases*, 2011, **17**(12): 2277–2286
- [64] Kfutwah A K W, Ngonu V, Ngoupo P A, *et al.* An antiretroviral drug-naive human immunodeficiency virus-1 infected woman with a persistent non-reactive proviral deoxyribonucleic acid polymerase chain reaction: a case report. *J Med Case Rep*, 2013, **7**(1): 152
- [65] Ndongmo C B, Switzer W M, Pau C P, *et al.* New multiple antigenic peptide-based enzyme immunoassay for detection of simian immunodeficiency virus infection in nonhuman primates and humans. *J Clin Microbiol*, 2004, **42**(11): 5161–5169
- [66] Chiodo F, Marradi M, Tefsen B, *et al.* High sensitive detection of carbohydrate binding proteins in an ELISA-solid phase assay based on multivalent glyconanoparticles. *PloS One*, 2013, **8**(8): e73027
- [67] Schneider L, Clausen J B, Garred P, *et al.* A high throughput automated quantitative 384 wells ELISA assay for simultaneous quantification of multiple parameters from the lectin complement pathway. *Mol Immunol*, 2013, **56**(3): 295
- [68] Komatsu N, Jackson H M, Chan K, *et al.* Fine-mapping naturally occurring NY-ESO-1 antibody epitopes in melanoma patients' sera using short overlapping peptides and full-length recombinant protein. *Mol Immunol*, 2013, **54**(3): 465–471
- [69] Gomara M J, Fernandez L, Perez T, *et al.* Assessment of synthetic chimeric multiple antigenic peptides for diagnosis of GB virus C infection. *Analytical Biochemistry*, 2010, **396**(1): 51–58
- [70] Zhou J, Zhao S, Zhang J, *et al.* An indirect competitive enzyme-linked immunosorbent assay for bisphenol-A based on the synthesis of a polylysine-hapten conjugate as a coating antigen. *Analytical Methods*, 2013, **5**(6): 1570–1576
- [71] 陈翊平. 基于量子点的荧光免疫分析在几种农兽药残留检测中的应用研究[D]. 湖北: 华中农业大学, 2010
- Chen Y P. Fluoroimmunoassay based on quantum dot for the detection of several pesticide and veterinary drugs residuum [D]. Hubei: Central China Agricultural University, 2010
- [72] 肖锡峰, 江小群, 周雷激. 聚乙二醇表面改性抑制蛋白质非特异性吸附. *分析化学*, 2013, **3**(41): 445–453
- Xiao X F, Jang X Q, Zhou L J. *Analytical Chemistry*, 2013, **3**(41): 445–453
- [73] 胡小艳. 以 PAMAM 为间隔臂的仿生特异性免疫吸附材料的点击法制备及其性能研究[D]. 广东: 华南理工大学, 2012

- Hu X Y. The preparation of pseudo-biospecific immunoadsorbent using PAMAM as spacer-arm by Click chemistry and study of its performance [D]. Guangdong: South China University of Technology, 2012
- [74] Liberelle B, Merzouki A, De Crescenzo G. Immobilized carboxymethylated dextran coatings for enhanced ELISA. *J Immunol Methods*, 2013, **389**(1-2): 38-44
- [75] Šebestík J, Reiniš M, Ježek J. Dendrimers and Solubility [M]// *Biomedical Applications of Peptide-, Glyco- and Glycopeptide Dendrimers, and Analogous Dendrimeric Structures*. Springer Vienna, 2012: 105-109
- [76] Estevez M C, Kreuzer M, Sanchez-Baeza F, *et al.* Analysis of nonylphenol: advances and improvements in the immunochemical determination using antibodies raised against the technical mixture and hydrophilic immunoreagents. *Environmental Science & Technology*, 2006, **40**(2): 559-568
- [77] Montañez M I, Mayorga C, Torres M J, *et al.* Dendrimeric Antigens. *New Approaches Towards Detection of IgE-Mediated Drug Allergy Reactions. Dendrimers in Biomedical Applications*, 2013: 84-98
- [78] 肖 飞. 新型电化学免疫传感器的制备及其在食品安全检测中的应用研究[D]. 上海: 华东师范大学, 2012
Xiao F. Study on novel electrochemical immunosensors based on nanomaterials and their application in food safety detection [D]. Shanghai: East china normal university, 2012
- [79] 刘继超, 姜铁民, 陈历俊, 等. 电化学免疫传感器在食品安全检测中的研究进展. *中国食品添加剂*, 2011(01): 216-222
Liu J C, Jiang T M, Chen L J, *et al.* *China Food Additives*, 2011 (01): 216-222
- [80] Jiang X, Wang L, Wang J, *et al.* Gold nanomaterials: preparation, chemical modification, biomedical applications and potential risk assessment. *Appl Biochem Biotechnol*, 2012, **166**(6): 1533-1551
- [81] Ansari A A, Alhoshan M, Alsali M S, *et al.* Prospects of nanotechnology in clinical immunodiagnosics. *Sensors*, 2010, **10**(7): 6535-6581
- [82] Shi M, Chen J, Huang Y, *et al.* A multicolor nano-immunosensor for the detection of multiple targets. *RSC Adv*, 2013, **3**(33): 13884-13890
- [83] Bosnjakovic A, Mishra M K, Han H J, *et al.* A dendrimer-based immunosensor for improved capture and detection of tumor necrosis factor- α cytokine. *Anal Chim Acta*, 2012, **720**: 118-125
- [84] Han H J, Kannan R M, Wang S X, *et al.* Multifunctional dendrimer-templated antibody presentation on biosensor surfaces for improved biomarker detection. *Adv Func Mat*, 2010, **20**(3): 409-421
- [85] Bosnjakovic A, Mishra M K, Han H J, *et al.* A dendrimer-based immunosensor for improved capture and detection of tumor necrosis factor-alpha cytokine. *Analytica Chimica Acta*, 2012, **720**: 118-125
- [86] Jeong B, Akter R, Han O H, *et al.* Increased electrocatalyzed performance through dendrimer-encapsulated gold nanoparticles and carbon nanotube-assisted multiple bienzymatic labels: highly sensitive electrochemical immunosensor for protein detection. *Analy Chem*, 2013, **85**(3): 1784-1791
- [87] Šebestík J, Reiniš M, Ježek J. Dendrimers as Biosensors and Imaging Tools [M]// *Biomedical Applications of Peptide-, Glyco- and Glycopeptide Dendrimers, and Analogous Dendrimeric Structures*. Springer Vienna, 2012: 191-195
- [88] Ruiz-Sanchez A J, Montanez M I, Mayorga C, *et al.* Dendrimer-modified solid supports: nanostructured materials with potential drug allergy diagnostic applications. *Curr Med Chem*, 2012, **19**(29): 4942-4954

Progress on The Application of Dendrimers to Improve Performance of Immunoassays*

LIU Feng-Yin, SHEN Yu-Dong, SUN Yuan-Ming**, WANG Hong, LEI Hong-Tao, YANG Jin-Yi, XU Zhen-Lin**
(Guangdong Provincial Key Laboratory of Food Safety and Quality, South China Agricultural University, Guangzhou 510642, China)

Abstract Immunoassay based on antigen-antibody interaction plays an important role in the screening of low molecular mass organic contaminations such as pesticides, veterinary drugs and biological toxins. However, due to the lack of epitope groups of haptens, the production of antibodies with high affinity is still one of the bottlenecks of immunoassay for small molecules. Dendrimers, as a new type polymer, exhibit many excellent structural properties and histocompatibility, such as clear molecular composition, regular, highly branched and nanometer-sized structure, monodisperse property and presenting dense functional groups on its surface. Previous studies had revealed that dendrimers are potential in the improving performance of immunoassay, such as to produce antibodies with higher affinity, produce antibodies with broad-specificity and improve assay sensitivity. In this work, therefore, the application of dendrimers as carrier to prepare immunogens and coating antigens, as adjuvant to improve immunogenicity, as carrier to amplify signal were reviewed. The potential of application of dendrimers on the development of immunoassays for small molecules was also discussed.

Key words dendrimers, antibody preparation, immunoassay, application

DOI: 10.3724/SP.J.1206.2013.00399

* This work was supported by grants from The National Natural Science Foundation of China (31271865, 31301467), The National Basic Research Program of China (2012CB720803) and The Natural Science Foundation of Guangdong Province, China (S2012040008046).

**Corresponding author.

SUN Yuan-Ming. Tel: 13922770369, E-mail: ymsun@scau.edu.cn

XU Zhen-Lin. Tel: 13570552215, E-mail: xzlin@scau.edu.cn

Received: September 6, 2013 Accepted: January 22, 2014