DOI: 10.19812/j.cnki.jfsq11-5956/ts.20260117001
引用格式: 覃丹凤, 魏知非, 相亦飞, 等. 小分子化合物特异性兔源单克隆抗体制备技术研究进展[J]. 食品安全质量检测学报, 2026, 17(12): 199–209.
QIN DF, WEI ZF, XIANG YF, *et al*. Research progress on preparation technology of rabbit-derived monoclonal antibodies specific to small molecule compounds [J]. Journal of Food Safety & Quality, 2026, 17(12): 199–209. (in Chinese with English abstract).

小分子化合物特异性兔源单克隆抗体制备技术研究进展

覃丹凤[1,2], 魏知非[1], 相亦飞[1], 吕顺全[2], 陈昱庄[1], 秦 誉[2], 丛晶晶[2], 曹轶瀛[2], 陈海兰[1], 何家康[1*]

(1. 广西大学动物科学技术学院, 南宁 530004; 2. 北京维德维康生物技术有限公司, 北京 100080)

摘 要: 兽药残留、农药和真菌毒素等食品安全小分子化学危害物及其代谢物在食品和环境中广泛且痕量存在, 具有潜在的致癌、致畸和内分泌干扰等毒性, 亟需灵敏、快速、高通量的筛查手段。以抗体为识别元件的免疫检测成本低、速度快、易于现场应用, 其性能高度依赖于高亲和力、高特异性单克隆抗体。由于兔源抗体具备体细胞高频突变和基因转换的双重免疫机制, 兔源抗体库具有较高的多样性和表位分辨率, 使其成为食品安全小分子单克隆抗体的重要来源之一。目前食品安全检测中使用的高亲和力抗体仍以兔源多克隆抗体为主, 但其批次一致性差、表位组成复杂及难以标准化和长期稳定供应, 制约了免疫检测方法的工程化应用。兔源单克隆抗体具备高亲和力, 表位单一、可重复性强和可工程化改造等优势, 在小分子免疫识别领域具有重要应用潜力。本文围绕小分子半抗原设计与兔源抗体免疫策略, 综述兔源杂交瘤、展示文库和单 B 细胞等抗体发现平台在小分子兔源单克隆抗体制备中的研究进展, 比较各平台在筛选通量、天然重链轻链可变区配对保留、假阳性克隆控制和工程改造潜力等方面的特点与局限, 并总结兔源小分子单克隆抗体在酶联免疫测定、免疫层析以及电化学和光学免疫传感器中的应用, 讨论其在复杂基质适应性、多残留检测和方法标准化方面的机遇与瓶颈。随着单细胞组学、微流控和计算机辅助抗体设计技术的发展, 基于兔模型的高亲和力抗小分子抗体有望实现流程化、规模化开发, 为食品安全与环境监测提供更可靠的免疫识别元件。

关键词: 兔源单克隆抗体; 小分子半抗原; 抗体发现; 兔源杂交瘤; 单 B 细胞技术; 微流控; 免疫检测

Research progress on preparation technology of rabbit-derived monoclonal antibodies specific to small molecule compounds

QIN Dan-Feng[1,2], WEI Zhi-Fei[1], XIANG Yi-Fei[1], LV Shun-Quan[2], CHEN Yu-Zhuang[1], QIN Yu[2], CONG Jing-Jing[2], CAO Yi-Ying[2], CHEN Hai-Lan[1], HE Jia-Kang[1*]

收稿日期: 2026-01-17
基金项目: 广西重点研发计划项目(桂科 AB23026082); 大学生创新创业训练计划项目(202310593445)
第一作者: 覃丹凤(1989—), 女, 硕士, 工程师, 主要研究方向为食品安全检测。E-mail: 303998433@qq.com
***通信作者:** 何家康(1976—), 男, 博士, 教授, 主要研究方向为新兽药创制与应用。E-mail: jkhe@gxu.edu.cn

(1. *Animal Science and Technology College*, *Guangxi University*, *Nanning* 530004, *China*;
2. *Beijing WDWK Biotechnology Co*., *Ltd*., *Beijing* 100080, *China*)

ABSTRACT: Veterinary drug residues, pesticides, mycotoxins and their metabolites are widely present in food and environmental matrices at trace levels and pose potential carcinogenic, teratogenic and endocrine-disrupting risks, thereby necessitating the development of sensitive, rapid and high-throughput screening methods. Immunoassays employing antibodies as recognition elements are widely used in food safety monitoring owing to their low cost, rapid response and suitability for on-site analysis; however, their analytical performance largely depends on the availability of monoclonal antibodies with high affinity and specificity. Owing to the dual immune mechanisms of high-frequency somatic hypermutation and gene conversion, rabbit antibody repertoires exhibit remarkable diversity and superior epitope resolution, making rabbits an important source of monoclonal antibodies against small-molecule food contaminants. At present, high-affinity antibodies used in food safety immunoassays are predominantly rabbit polyclonal antibodies, which suffer from inherent limitations such as batch-to-batch variability, complex epitope composition, and difficulties in standardization and long-term stable supply, thereby restricting the engineering and industrialization of immunoassay methods. In contrast, rabbit monoclonal antibodies offer distinct advantages, including high affinity, single-epitope specificity, excellent reproducibility and amenability to genetic and structural engineering, highlighting their significant potential in small-molecule immunorecognition. This review focused on the design of small-molecule haptens and rabbit immunization strategies. It reviewed the recent advances in rabbit monoclonal antibody discovery platforms, including hybridoma technology, display libraries and single B-cell–based approaches, for the generation of rabbit monoclonal antibodies against small molecules. This review compared the strengths and limitations of these platforms in terms of screening throughput, preservation of native heavy- and light-chain variable region pairing, control of false-positive clones and antibody engineering potential. It also summarized the applications of rabbit monoclonal antibodies against small molecules in enzyme-linked immunoassays, lateral flow immunoassays and electrochemical and optical immunosensors discussed the opportunities and challenges associated with complex matrix tolerance, multi-residue detection and methodological standardization. Finally, this review highlighted the continued development of single-cell omics, microfluidics and computer-aided antibody design, which was expected to facilitate the development of rabbit-derived high-affinity antibodies against small molecules through more standardized and scalable workflows, thereby providing more reliable immunorecognition elements for food safety and environmental monitoring.

KEY WORDS: rabbit-derived monoclonal antibodies; small molecule haptens; antibody discovery; rabbit-derived hybridoma; single B cell technology; microfluidics; immunoassay

0 引 言

兽药残留、农药残留、真菌毒素等小分子化学危害物广泛存在于饲料、畜禽产品及环境介质中，即使暴露水平较低，仍具有肝毒性、致癌性和内分泌干扰等潜在风险，是当前食品安全与环境健康监测的重点危害物[1–2]。小分子化学危害物的确证分析主要依赖液相/气相色谱-质谱联用，可实现多组分、高选择性的定量分析，已成为国际监管体系中的金标准方法[1–3]。然而，色谱-质谱设备昂贵、前处理复杂、检测通量有限，难以实现大批量样本的现场快速检测[2]。

以抗体为识别元件的免疫分析方法，在农兽药残留和真菌毒素等食品安全危害物的快速筛查中得到广泛应用，可在满足灵敏度和特异性需求的前提下降低检测成本、缩短检测时间，是色谱-质谱技术的重要补充与前置筛查工具[3–5]。免疫分析方法的检测性能高度依赖于识别元件的亲和力和高特异。近年来，非竞争性半抗原免疫分析、抗免疫复合物抗体以及多种纳米材料信号放大策略的引入，显著提升了小分子免疫检测的灵敏度和抗干扰能力，为复杂基质样品的高通量筛查提供了新的解决方案[4–6]。

与蛋白等大分子不同，小分子化合物本身缺乏免疫原性，需经理性半抗原设计与载体偶联，将关键结构片段以合适的空间取向暴露给宿主免疫系统；半抗原结构的细微差异即可显著影响所得抗体的亲和力与选择性[3–4,7]。在宿主选择方面，兔兼具体细胞高频突变与基因转换双重机制，能够构建更为多样的抗体库，其抗体往往具有更深的结合口袋和更精细的表位识别，在靶向小分子和复杂表位

时表现出独特优势[8−10]。最新的兔免疫后 B 细胞受体(B cell receptor, BCR)谱系研究显示, 针对小分子半抗原的重复免疫可促进抗体的重链可变区中第三条互补决定区(complementarity-determining region of the heavy chain 3, CDRH3)延长、表面电荷重排以及亲和力阶梯性提升[10−11]。

近年来, 兔源单克隆抗体获取已衍生出多种细胞工程和筛选路径。一方面, 经典杂交瘤与展示文库技术不断在融合伴侣、文库构建和亲和力成熟策略上迭代, 提升了针对复杂小分子表位的抗体挖掘效率[12−14]。另一方面, 以单 B 细胞分选、微孔阵列与液滴微流控为基础的高通量功能筛选平台快速发展, 可在保留天然 VH/VL 配对的前提下, 实现对数至 10^5 级分泌细胞的并行分析与富集[12−15]。本文聚焦靶向小分子污染物的兔源单克隆抗体, 以半抗原设计与兔免疫策略为切入点, 系统梳理兔源杂交瘤、展示文库与单 B 细胞平台在抗小分子抗体发现中的最新进展, 比较其在筛选通量、天然配对保留、假阳性控制及工程改造潜力等方面的特点和局限, 并结合兔源小分子抗体在食品检测等领域常见的酶联免疫分析、胶体金侧向层析及新型免疫传感器中的典型应用案例, 讨论其在食品等复杂基质适应性、多残留协同检测及方法标准化方面所面临的机遇与挑战, 为构建面向食品安全监测的流程化、规模化的高亲和力兔源单克隆抗体的制备提供参考。

1　宿主选择与兔源单克隆抗体的优势

小分子靶标通常由有限的芳香环、杂环及官能团构成, 可被免疫系统区分的结构信息相对集中。与蛋白等大分子抗原相比, 小分子抗体的结合能力更依赖抗体结合位点的空间构型、电荷分布及对细微结构差异的分辨水平。因此, 宿主免疫系统形成抗体库多样化的机制在很大程度上决定了最终获得抗体的亲和力与特异性。

与主要依赖体细胞高频突变(somatic hypermutation, SHM)进行亲和力成熟的小鼠模型不同, 兔子的免疫反应过程中, 抗体可变区序列多样性的形成不仅由 SHM 引入点突变, 还通过广泛的基因转换机制产生大量序列变体[9,16]。基因转换过程主要发生在抗原刺激后的生发中心或类生发中心组织中, 将位于功能性可变区基因上游的伪基因片段替换进功能性可变区, 从而引入大范围的序列替换, 显著改变抗体的表位识别潜能[9,16]。相比之下, 小鼠和人类在免疫过程中主要依赖 SHM 来逐步积累点突变以提升亲和力, 而基因转换在这些物种中极为罕见。因此, 兔子的 SHM 和基因转换机制的协同作用可以在较短的免疫周期内增加抗体可变区序列的多样性, 拓展抗体对抗原表位结构的识别范围, 从而提升兔源单克隆抗体在识别小分子和微小表位差异方面的优势。有研究显示, 兔源抗体重链可变区中 CDRH3 长度分布范围更宽、构象可塑性较强, 较易形成较深的结合口袋, 从而有利于容纳小分子疏水骨架并对关键官能团实现精细识别, 提高对微小结构差异的区分能力[17], 见图 1。对于分子量较小、表位数量少或构象受限的小分子化合物, 兔源抗体往往可获得较高的亲和力与较好的表位分辨能力, 在复杂表位或难识别靶标抗体制备场景中凸显优势[8−10]。除静态序列与结构特征分析外, 近年来的兔子免疫后 BCR 谱系研究从时间和动力学维度揭示了抗体可变区在反复免疫与亲和力成熟过程中逐步演化的轨迹, 为兔抗体的识别优势的形成机制提供了直接证据。对小分子半抗原的重复免疫可驱动兔 BCR 谱系发生定向演化, 表现为 CDRH3 延长、可变区表面电荷重排以及亲和力的提升[10−11]。随着免疫轮次的增加, CDRH3 中带电氨基酸组成的系统性变化可能增强兔源抗体与小分子靶标之间的静电互补及氢键作用; 同时, 通过多个谱系的逐步筛选与扩增可实现亲和力成熟, 从而富集少数高亲和力、高选择性的优势克隆[10−11]。这一免疫动力学特征阐释了兔源抗体在小分子免疫检测中表现出高灵敏度及高稳定交叉反应谱的分子机制, 也为后续选择基于兔模型开展高亲和力小分子单克隆抗体发现提供了理论依据。

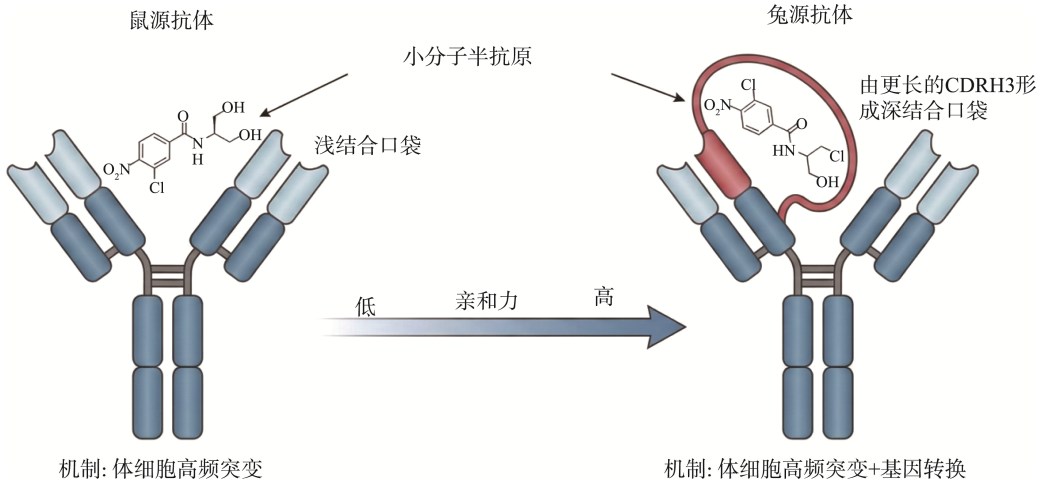


图 1　鼠源与兔源抗体结构、亲和力成熟机制的差异

Fig.1　Discrepancy of antibody structure and affinity maturation mechanism between mouse and rabbit-derived antibodies

在小分子免疫分析中，越来越多研究表明，兔源单克隆抗体在亲和力强度、特异性、复杂基质耐受等方面已出现可量化的优势。以麻痹性贝类毒素(saxitoxin, STX)为例，研究者为克服传统鼠源单抗亲和力不足的问题，采用单 B 细胞分选培养与交叉选择获得兔源单抗，报道其灵敏度较鼠源单抗提高约 100 倍，半数抑制浓度(half maximal inhibitory concentration, IC_{50})为 0.018 ng/mL，且在强酸/强碱(pH 3~12)及 30%甲醇条件下稳定性更佳[3]。在尿液等复杂基质中，鼠源单抗常因尿素导致构象不稳定而使免疫分析灵敏度显著下降。LI 等[4]筛得一株对莱克多巴胺具有高亲和力且可耐受 3 mol/L 尿素的兔源单克隆抗体，其亲和力比最佳的鼠单克隆抗体提升 100 倍。LIANG 等[5]利用单 B 细胞克隆技术制备了抗 T-2 兔单克隆抗体，其 IC_{50} 为 0.089 ng/mL，亲和力高于小鼠单克隆抗体。上述研究从不同小分子靶标与复杂基质应用场景出发，表明兔源单克隆抗体在亲和力水平、结构稳定性及基质耐受性等性能上具有明显的优势，为其在高灵敏小分子免疫分析中的应用奠定了分子基础。

2 抗原合成与免疫策略

小分子靶标获得高质量抗体的关键在于能否在体内有效呈递并定向放大母体结构对应的预期表位。半抗原结构、载体以及免疫程序共同决定免疫应答的表位指向与亲和力成熟路径，从而塑造 B 细胞库中目标表位克隆的丰度与质量，进而影响后续杂交瘤、展示文库与单 B 细胞等平台能否高效捕获高亲和力、低交叉反应且靶向母体核心结构的优势克隆[18–23]。因此，在开展兔源单克隆抗体研究时，有必要首先阐明抗原合成与免疫策略。兔源单抗的发现多依赖于体内亲和力成熟后的记忆 B 细胞库，若前端抗原设计与免疫引导不足，极易放大抗载体、抗连接臂等非目标应答，导致后期筛选成本上升且命中率下降。由此，抗原合成与免疫策略既是为何选择兔源单抗的重要依据，也是提高兔源单抗发现效率与可重复性的前提条件。

2.1 靶标结构与表位拆解

小分子通常仅包含少数芳香环、杂环及官能团，可被免疫系统区分的结构特征相对较少[18–19]。因此，半抗原设计时应确定驱动免疫应答的关键基团，并避免放大保守骨架，以在亲和力与特异性之间取得平衡[18–20]。通过对小分子靶标进行表位拆解并结合结构特征进行理性设计，优化半抗原的偶联位点和连接臂结构，有助于引导免疫应答指向预期表位，从而显著提升抗体的表位指向性和识别性能。在具体应用中，针对单一靶标的检测通常应强化半抗原分子中最具结构差异性的关键特征基团，以提高抗体的特异性。而在类群化合物的筛查中，则在需在保证灵敏度的前提下适度保留共有骨架结构，以实现受控的广谱识别[19–23]。因而，表位拆解既是小分子结构解析环节，也是后续检测策略选择的前提。

2.2 半抗原设计与抗原合成

半抗原设计时，应在尽量保持母体关键识别结构的前提下，引入可偶联位点并合理设计连接臂，以获得取向可控、表位充分暴露且批次稳定的免疫原/检测抗原组合。偶联位点决定半抗原在载体表面的取向及表位暴露，设计时应避开预计参与抗体识别的关键官能团，优先选择对母体结构影响较小且相对外露的部位进行衍生化，否则易诱导识别连接臂或载体邻近结构的抗体，导致靶向性不足[18–20]。连接臂为半抗原和载体蛋白提供必要的空间缓冲，其长度过短易导致半抗原表位被载体遮蔽，过长则柔性增大并可能增加对连接臂的非特异应答；实践中，常针对同一靶标设计不同长度与理化性质的连接臂，并通过小规模免疫或竞争试验进行优选，以兼顾灵敏度与特异性[18–21]。半抗原衍生化路线通常依据母体官能团确定(表 1)：含-OH/-NH_2者常通过酰化(如琥珀酸酐、戊二酸酐)引入末端羧基连接臂；含 C=O 者可采用肟化/腙化(如羧甲氧胺等)实现定点引入连接臂；含 Ar–NH_2者可经 $NaNO_2$/HCl 重氮化衍生；含-COOH 者多通过酰胺化引入连接臂或先活化以提高偶联效率[24–25]。近年来，分子构象分析和分子对接等计算化学手段已被用于辅助半抗原理性设计，通过预测关键官能团与潜在结合位点的相互作用，为偶联位点与连接臂结构优化提供依据，从而提高抗原设计的成功率与效率[24]。

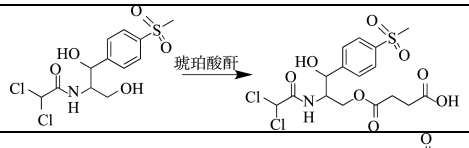
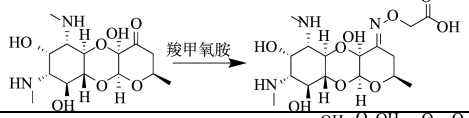
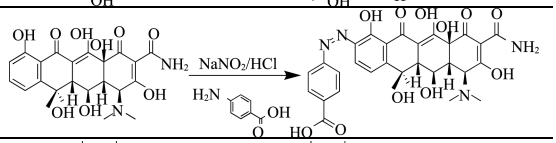
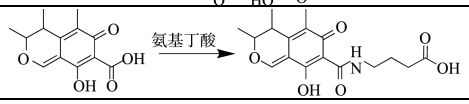
小分子分子量低、表位稀少，无法独立引发 BCR 交叉链接和 T 细胞辅助两类免疫必需信号，因此不能激发完全的体液免疫应答。通过化学偶联将小分子与高分子载体蛋白形成完全抗原，可提供多价表位促进 BCR 聚集激活，并使载体蛋白的肽段通过抗原提呈细胞-主要组织相容性复合体 II 类分子(major histocompatibility complex class II, MHC II)途径激活 T 辅助细胞，从而完成抗体亲和力成熟与高亲和力克隆的产生[26–27]。钥螺血蓝蛋白(keyhole limpet hemocyanin, KLH)免疫原性强且偶联位点丰富，常用作免疫原，牛血清白蛋白(bovine serum albumin, BSA)、卵白蛋白(ovalbumin, OVA)溶解性好、批间稳定，常用作包被原。免疫原与检测抗原采用异源载体组合以避免抗载体蛋白抗体的干扰，从而提升免疫检测的特异性和灵敏度。载体蛋白偶联多采用 1-乙基-(3-二甲基氨基丙基)碳二亚胺/N-羟基琥珀酰亚胺 [1-ethyl-3-(3-dimethylaminopropyl) carbodiimide/N-hydroxysuccinimide, EDC/NHS]缩合、戊二醛交联及活性酯体系，工艺优化时需兼顾小分子与载体结构完整性及批次重现性[18–19,28–31]。

2.3 抗原表征与筛选

完全抗原的免疫原性不仅取决于半抗原设计，还高度依赖偶联产物的理化性质。免疫原的结构完整性、偶联密度和均一性直接影响 BCR 识别、抗原呈递细胞处理及 T 辅助细胞激活，从而决定免疫反应强度、抗体特异性和

表 1　小分子半抗原设计的典型衍生化策略

Table 1　Typical derivatization strategies for small molecule hapten design

官能团	衍生化方法	典型衍生试剂	反应示例
羟基(-OH)/氨基(-NH_2)	酰化法	琥珀酸酐 戊二酸酐	
醛/酮(C=O)	肟化法 腙化法	羧甲氧胺 对羧基苯肼	
芳香伯胺 (Ar-NH_2)	重氮化法	$NaNO_2$/HCl	
羧基(-COOH)	羧胺缩合法	氨基丁酸	

亲和力成熟效率。免疫原质量控制不当, 可能导致免疫应答低弱, 增加载体背景反应、交叉反应, 进而妨碍后续抗体筛选和识别性能。因此, 在动物免疫前对免疫原的理化性质进行严格评估与优化, 是提高抗体制备成功率和质量的必要步骤。在理化性质层面, 对免疫原的质量控制主要包括以下几个方面: (1)偶联比需控制在预设范围内, 避免半抗原密度过低或过高所致的免疫原性下降; (2)载体蛋白的构象应基本保持完整, 不出现显著聚集或降解现象; (3)半抗原在偶联及纯化过程中应保持结构稳定[18,20]。常用基质辅助激光解吸飞行时间质谱对小分子–牛血清白蛋白(bovine serum albumin, BSA)偶联物进行分子量表征, 并采用质量增量法估算平均偶联比。其思路是: 分别对 BSA 对照与小分子半抗原-BSA 偶联物进行脱盐或超滤, 去除游离半抗原及小分子试剂, 选用适合蛋白检测的基质, 在正离子线性模式采集主峰分子量, 以 $\Delta M=M_{\text{偶联物}}-M_{\text{BSA}}$ 计算分子量增量, 并按 $n=\Delta M/M_{\text{半抗原}}$换算平均偶联数, 从而实现对不同偶联密度的区分与优化。多项针对兽药及染料残留的小分子免疫分析研究表明, 通过小规模免疫结合竞争酶联免疫吸附法对不同半抗原设计进行前期预筛选, 可在进入大规模兔免疫阶段之前有效剔除免疫原性较差或交叉反应严重的方案, 从而显著降低后续单克隆抗体筛选的风险与成本[19–21]。虽然该环节在整体工作量中所占比例有限, 但对后续抗体发现流程的效率与所得抗体质量具有关键影响。

2.4　兔子免疫采血策略

兔子可为多种抗体发现平台提供充足的细胞与血清来源, 但免疫程序的设计与执行是下游技术路线能否取得高质量克隆的前提[8,11,32]。常用策略为初免联合多次加强免疫, 初免用于启动并扩展多样化的应答克隆, 加强免疫则推动体内亲和力成熟并提高抗原特异性细胞比例。已有针对小分子半抗原的研究表明, 重复免疫可促使 BCR 谱系发生定向演化, 并伴随互补决定区 3 (complementarity-determining region 3, CDR3)特征的调整, 从而更有利于富集适合小分子结合需求的高亲和力克隆[11]。终末免疫和取材时机需与后期的抗体发现平台匹配, 杂交瘤制备通常在终末免疫后短期内获取脾或淋巴结以保证活化 B 细胞数量与融合效率, 单 B 细胞分选或液滴微流控筛选多选择在血清滴度稳定且处于较高水平时采集外周血, 并可在采样前追加小剂量加强免疫以提高抗原特异性细胞占比[8,11,32]。免疫佐剂是与抗原共同使用以非特异性增强机体免疫反应的物质, 通过激活先天免疫细胞来强化适应性免疫应答。按作用机制可粗略分为两类: 一类是递送系统(如矿物盐、乳剂、脂质体/病毒样颗粒等), 通过延长抗原滞留并提高抗原向抗原呈递细胞的递送与摄取; 另一类是免疫刺激剂, 如模式识别受体(pattern recognition receptors, PRRs)配体或病原体相关分子模式(pathogen-associated molecular patterns, PAMPs), 直接激活抗原呈递细胞以增强抗原呈递信号和共刺激信号, 从而提高 T 细胞与 B 细胞的激活效率, 两类机制协同作用显著提高疫苗的免疫原性与效能[22–23]。

3　兔源单克隆抗体制备技术

3.1　兔源杂交瘤技术

兔源杂交瘤技术是在经典小鼠杂交瘤体系基础上发展而来, 其基本思路是将免疫兔的抗体分泌 B 细胞与同源兔髓样瘤细胞(如 240E-1、240E-W2)进行融合, 从而获得能够稳定分泌单克隆抗体的兔-兔杂交瘤细胞系(图 2A)[33]。受限于早期缺乏合适且稳定的兔髓样瘤融合伴侣, 该技术在相当长一段时间内难以推广应用。SPIEKER-POLET 等[33]为解决无可用融合伴侣这一核心瓶颈, 构建携带 *c-myc* 与 *v-abl* 转基因的兔模型并诱导形成浆细胞瘤, 从中分离得到

浆细胞瘤细胞系并筛选获得对次黄嘌呤-氨基蝶呤-胸苷(hypoxanthine-aminopterin-thymidine, HAT)敏感的克隆240E-1, 随后将其与免疫兔脾细胞融合, 获得能持续分泌特异性抗体的兔-兔杂交瘤, 同时该类杂交瘤可克隆化及冻存, 且在体内传代条件下仍能保持分泌能力, 从而奠定了兔源单抗制备的可操作基础。其后, YAM 等[34]对兔杂交瘤技术流程进行了方法学整理与规范化, 明确以240E-1为融合伴侣可形成更易复现的实验路线, 为实验室层面应用提供了标准化参考。需要指出的是, 兔杂交瘤融合伴侣的建立与改良工作主要集中于上世纪末至本世纪初, 后续相关研究相对减少可能与早期兔-兔杂交瘤在长期培养中分泌稳定性差、改良细胞系受专利保护以及抗体制备的主流路线逐步转向展示文库与单细胞技术等因素有关[33–34]。尽管如此, 在小分子检测领域, 兔源杂交瘤依然能够产出用于建立免疫检测方法的高亲和力单克隆抗体。例如, LIU 等[16]通过兔杂交瘤获得抗磺胺兔单克隆抗体, 并据此建立竞争间接酶联免疫吸附测定(enzyme-linked immunosorbent assay, ELISA), 检出限可达 0.1 ng/mL。这些研究表明, 在合理的半抗原设计和免疫策略前提下, 兔杂交瘤平台能够捕获亲和力和特异性均优于常规小鼠抗体的克隆。

然而, 兔源杂交瘤技术亦存在一定的局限性。其细胞融合效率相对较低, 易导致杂交瘤文库多样性丢失, 且整体筛选通量低且周期相对较长。另外, 小分子半抗原本身免疫原性较弱, 特异性克隆在杂交瘤文库中所占比例较低, 常规基于微孔板 ELISA 的筛选方式难以从大量背景克隆中高效捕获极少数的高亲和力克隆[35]。此外, 该技术高度依赖细胞融合、单克隆筛选及长期传代过程, 在解析 BCR 库结构、捕获低丰度克隆以及快速工程化改造方面难以满足高通量和精细化筛选的需求。总体而言, 兔源杂交瘤技术更适合用于靶标数量相对有限, 但对抗体亲和力和特异性要求较高的小分子单克隆抗体的获取, 在实际应用中可作为展示文库、单 B 细胞及液滴微流控等高通量抗体发现平台的有益补充。

3.2 基于展示文库的兔源抗体发现

展示文库技术(如噬菌体展示、酵母展示等)为兔源抗体的高通量筛选与体外工程化优化提供了重要平台, 尤其适用于亲和力要求高、可识别表位有限的小分子半抗原[36]。兔源展示文库的构建形式较为多样, 常见包括: (1)以免疫兔 B 细胞为来源的免疫文库; (2)在免疫文库基础上对 CDR 区域进行定向随机化的半合成文库; (3)将兔可变区与人源恒定区拼接构建的嵌合抗原结合片段(fragment antigen-binding, Fab)文库等(图 2B)[37]。与兔源杂交瘤和单 B 细胞技术不同, 展示文库更强调在免疫基础上对抗体库进行扩增与二次多样化, 并通过体外可控筛选压力实现亲和力与特异性的迭代提升[38]。针对小分子靶标, 实践中通常优先选用免疫文库或免疫文库基础上的定向多样化策略, 以尽可能保留体内亲和力成熟的克隆并提高获得高亲和力克隆的概率。同时, 可通过优化筛选体系对交叉反应谱进行约束, 例如更换包被半抗原的偶联位点与载体、在筛选过程中加入游离小分子或结构类似物进行竞争结合等, 从而在富集高亲和力克隆的同时降低抗载体、抗连接臂等假阳性克隆的比例[36,38]。

近 5 年来, 基于兔展示文库的小分子抗体报道相对较少, 但已有的研究工作表明该策略在小分子抗体制备中具有较高的可行性。例如, XU 等[37]以微囊藻毒素-LR (microcystin-LR, MC-LR)免疫兔子并构建噬菌体展示 scFv 文库, 筛选获得高灵敏抗 MC-LR scFv, 并成功建立水样间接竞争 ELISA 方法, 检出限为 0.03~0.05 ng/mL。SOMPUNGA 等[39]通过兔噬菌体展示库中获取了抗玉米赤霉烯酮的 scFv, IC_{50}为 14 ng/mL。HUANG 等[40]等通过兔噬菌体展示文库获得了三聚氰胺特异 scFv, 其 IC_{50}为 1300 ng/mL。上述研究表明, 在半抗原设计合理、淘选条件设置得当的前提下, 展示文库能够有效挖掘抗小分子兔源重组抗体, 为食品安全与环境监测等领域开展兔源抗体工程提供了依据[37]。

需要指出的是, 展示文库技术亦存在一定局限。展示文库的构建与淘选流程相对复杂, 对分子克隆、展示系统操作及文库质量等要求较高; 筛选结果会受到文库覆盖度、CDR 设计方案以及表达框架的影响, 不同实验室在文库构建与淘选细节上的差异可能是导致结果不一致的原因。此外, 噬菌体展示对可变区表达与折叠具有一定偏好, 可能造成部分潜在的优良克隆在表达阶段丢失。随着兔抗体专用载体、酵母展示体系以及与高通量测序联用的文库解析技术的不断发展, 兔源展示文库在小分子抗体发现与工程优化中的应用前景值得关注, 并可与单 B 细胞和微流控筛选等技术形成互补, 为获得高亲和力、低交叉反应的兔源抗小分子单克隆抗体提供更多路径选择。

3.3 单 B 细胞技术

3.3.1 荧光激活细胞分选

基于流式分选的单 B 细胞技术是近年来发展起来的一类抗体发现方法。其基本思路是: 直接从体内将亲和力成熟的抗原特异性记忆 B 细胞分离出来, 获取天然配对的抗体可变重链和可变轻链(variable heavy chain/variable light chain, VH/VL)基因序列并进行重组表达, 从而避免兔杂交瘤体系不易建立、展示文库中重链与轻链随机配对等带来的限制[36]。该技术的常规流程为: 免疫兔至血清抗体效价较高后, 从外周血或脾脏分离 B 细胞并富集免疫球蛋白 G (immunoglobulin G, IgG)阳性细胞; 使用荧光标记的抗原探针对抗原特异性 B 细胞进行筛选与分选; 随后对单个阳性细胞进行 RT-PCR 扩增 VH/VL, 构建表达载体并表达重组抗体, 最终通过 ELISA、表面等离子体共振等方法评价其亲和力与特异性[41](图 2C)。现有研究已证实流式分选技术在兔源抗体发现中的可行性。LI 等[11]采用氯霉素

-BSA-异硫氰酸荧光素(fluorescein isothiocyanate, BSA-FITC)与抗兔 IgG-藻红蛋白(phycoerythrin, PE)标记策略, 对氯霉素特异的 IgG^+ B 细胞进行流式富集, 进一步解析 BCR 谱系并重组表达获得多株高亲和力兔单克隆抗体, 提示经流式分选富集的记忆 B 细胞群体能够输出质量较高的小分子抗体。以小分子-载体偶联物与荧光抗体联合标记兔记忆 B 细胞, 经流式分选获取单个小分子特异记忆 B 细胞并构建重组兔单克隆抗体的流程, 从工艺层面论证了该技术在小分子兔源单克隆抗体制备中的可行性及规模化生产的潜力[42]。

总体来看, 基于兔记忆B细胞的单细胞抗体发现技术在蛋白抗原领域已形成较为成熟的操作流程, 但在小分子靶标上的应用报道相对较少, 仍存在一定的技术瓶颈。其主要难点包括: 适用于兔记忆 B 细胞的表面标志物相对有限; 小分子-载体偶联物作为探针时易受多价结合效应和非特异背景影响, 导致分选信号的可检出性与亲和力区分能力难以兼顾; 此外, 低丰度高亲和力克隆的富集与后续快速验证仍需要更高效的流程支撑。随着兔 BCR 扩增引物体系和单细胞测序流程的完善、无细胞或微量表达验证平台的成熟, 以及小分子免疫原与探针标记策略的持续优化, 基于流式分选的单 B 细胞技术有望在抗小分子高亲和力兔源单克隆抗体的发现与工程化中, 逐步走向可复制的常规技术路线。

3.3.2　液滴微流控技术

液滴微流控技术利用油包水体系制备尺寸高度一致的皮升级液滴, 将单个抗体分泌细胞与抗原、检测试剂及条形码引物共同封装在微反应单元中, 从而在单细胞层面保持功能、细胞、序列的对应关系[43](图 2D)。与主要依赖细胞表面标记强弱的流式分选不同, 液滴微流控更强调以分泌抗体的功能读出作为筛选依据, 可在 10^4~10^6 数量级细胞规模内并行评价结合能力、竞争抑制或阻断效应等指标, 因此其在表位有限、对亲和力与特异性要求较高的小分子抗体发现中具有应用潜力[44]。针对小分子靶标, 可将液滴内反应设计为竞争检测模式, 即在同一液滴中加入标记半抗原与游离小分子, 通过竞争导致的荧光强度变化或能量转移信号对分泌细胞进行功能排序, 并进一步回收细胞获得 VH/VL 序列, 实现先看功能、再取序列的一体化流程[45]。

目前, 液滴微流控直接用于抗小分子抗体筛选的研究仍相对较少, 但其关键技术模块已在抗体发现领域得到验证。GÉRARD 等[43]提出的 CelliGO 平台, 将液滴内荧光功能测定与液滴内条形码反转录结合, 既能在液滴中对 IgG 活性进行高通量筛选, 又能获得天然配对的抗体可变区序列, 并据此重组表达验证抗体结合性能, 证明功能筛选与配对测序可在同一平台闭环完成。RUTKAUSKAITE 等[46]进一步给出了更直观的功能检测方案, 在液滴中加入两种荧光探针, 利用分泌抗体介导的荧光共振能量转移(fluorescence resonance energy transfer, FRET)产生信号, 实现对抗体分泌与亲和力的快速测定, 并通过液滴分选在一轮操作中实现约 800 倍的阳性细胞富集, 展示了液滴平台在功能导向富集上的效率优势。近年来, 液滴微流控技术在兔源抗体发现中的应用研究也开始出现。SHEMBEKAR 等[15]针对兔 B 细胞表面标志物有限、难以高效富集的痛点, 先用优化的抗体组合进行磁性阴性筛选富集 B 细胞, 再于液滴内设置两类功能检测: 对可溶性抗原采用颗粒聚集检测, 对膜抗原则引入报告细胞作为信号放大单元, 对阳性液滴对应细胞进行测序并体外表达验证。该研究可在脾脏取材后约 2 周内完成从筛选到抗体验证的流程, 极大缩短了抗体制备的周期。另一类微流控与常规流式组合的路线同样值得小分子检测领域借鉴。FISCHER 等[14]先用微流控将单个分泌细胞包埋到可捕获抗体的水凝胶微滴中, 形成围绕细胞的抗体捕获基质, 待抗体在局部富集后再添加荧光标记抗原/二抗, 通过常规流式进行细胞分选; 其主要流程包括液滴生成、凝胶化、破乳成珠、捕获试剂固定、流式分选、单细胞测序、重组表达等操作细节, 得到了高比例的具有靶标结合活性的表达抗体, 部分抗体达到亚纳摩尔水平的亲和力, 体现了该模块化方案的可复制性。DEJOUX 等[47]将罗库溴铵偶联至载体蛋白进行免疫, 随后采用液滴微流控分选与单细胞 VH/VL 测序联用, 获得大于 500 对天然配对序列并重组表达, 测得多株抗体对小分子药物达到亚纳摩尔级别的亲和力, 并进一步通过结构解析阐明结合方式, 为小分子、液滴功能筛选、序列解析、结构验证的路线提供了完整案例。

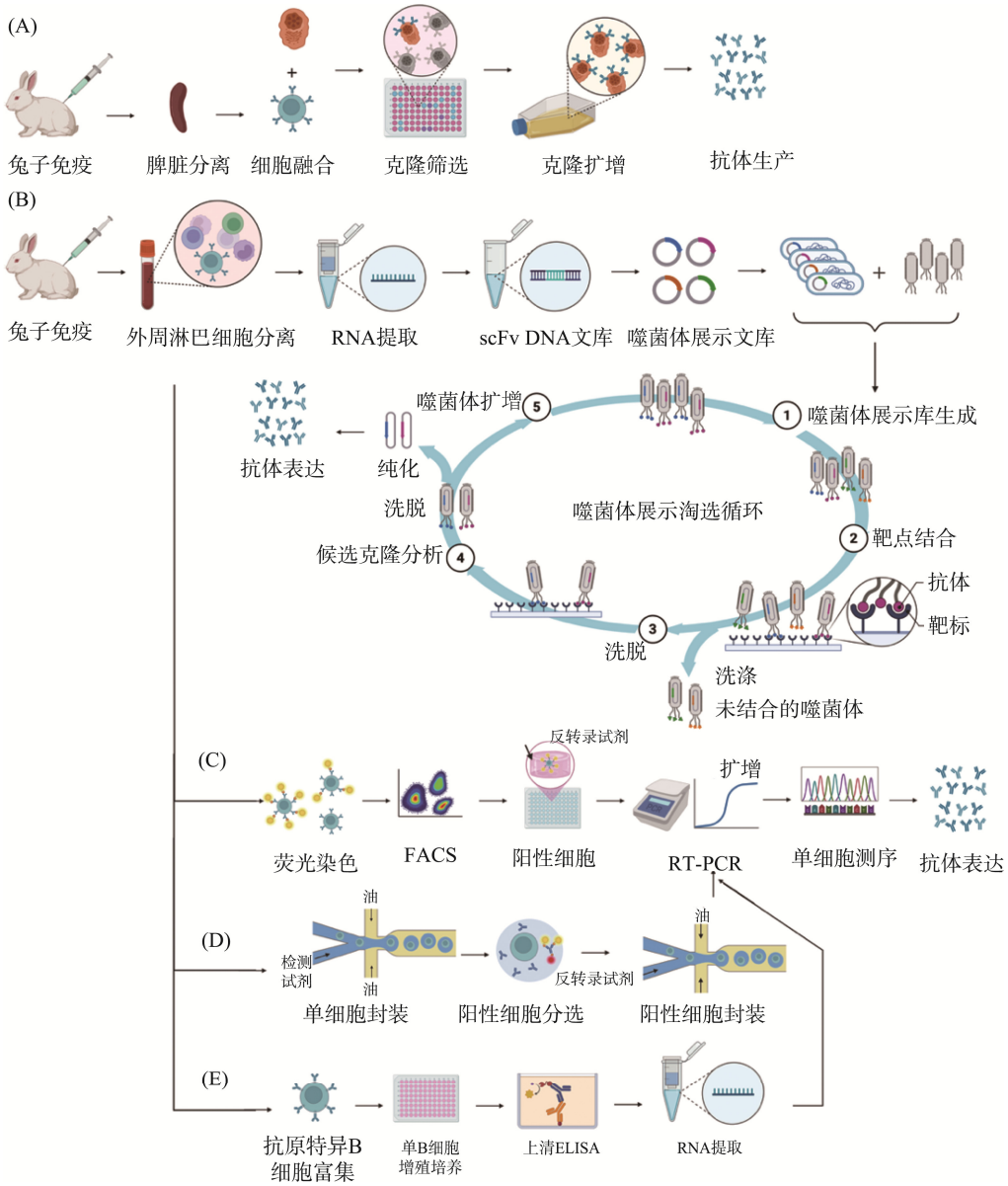
总体来看, 液滴微流控在抗体发现方面已具备较为扎实的技术基础, 但面向兔源抗小分子单克隆抗体的系统化整合研究仍相对不足。后续优化可从以下几方面开展: (1)提高兔外周 B 细胞在高通量封装、孵育及回收过程中的活性与回收率; (2)优化小分子探针在油水界面条件下的稳定性, 降低非特异吸附和背景信号, 保证竞争或能量转移检测的动态范围; (3)建立更适配兔子 BCR 的条形码扩增与序列配对的流程, 使功能筛选与序列信息实现稳定、准确的对应。在上述环节逐步完善后, 液滴微流控有望成为发现高亲和力兔源抗小分子单克隆抗体的重要技术平台, 并与流式分选单 B 细胞、展示文库等方法形成协同, 进一步提升抗体发现流程的效率与可重复性。

3.3.3　兔记忆 B 细胞体外激活与克隆技术

记忆B细胞体外激活与克隆技术, 是指将免疫动物来源的记忆B细胞或抗原特异B细胞在体外诱导分化为抗体分泌细胞, 获得可检测的单克隆抗体后进行功能筛选, 并进一步克隆 VH/VL 序列用于重组表达的方法。其常用流程为: 从外周血或淋巴器官分离并分选 IgG^+记忆 B 细胞/浆母细胞, 在表达 CD40L 的饲养细胞及适当细胞因子组合条件下, 以单细胞或低密度方式培养, 使其在短期内分泌可检测水平的 IgG; 收集培养上清开展多指标功能筛选,

筛得阳性孔后回收对应细胞并扩增 VH/VL 序列，构建重组表达载体并重组表达抗体(图 2E)。与直接单细胞 RT-PCR 方法相比，该策略可在真实分泌抗体的背景下完成功能评价；与展示文库筛选相比，能够保留天然重链与轻链配对关系，并更有利于从低丰度细胞群体中捕获功能表现突出的克隆。

现有研究已从方法学层面证明该技术在兔模型中具有可操作性。SEEBER 等[41]以外周血 B 细胞为起始材料，在 EL-4-B5 饲养层基础上添加合成生长因子培养基进行体外激活培养，使单细胞或低密度培养孔在较短时间内产生可检测水平的 IgG；随后直接以培养上清开展功能筛选，并对阳性孔细胞回收扩增 VH/VL，实现先功能筛选、再序列克隆的闭环流程。LI 等[48]进一步在筛选前增加了抗原预富集步骤：采用生物素化 Chi3l1 磁珠富集抗原特异记忆 B 细胞后，在 EL-4-B5 饲养层及 IL-2/IL-21 条件下进行单细胞培养，通过细胞上清功能检测确定阳性细胞克隆，并回收配对 VH/VL 重组表达，最终获得多株亚纳摩尔亲和力的单克隆抗体。相关专利亦表明，将该策略用于小分子半抗原时，可通过小分子-载体偶联物对特异 B 细胞进行预富集，从而显著提升后续单孔培养中小分子特异 IgG^+克隆的检出比例(由约 1%提升至约 34%)，提示该技术在低丰度特异克隆富集方面具有明显优势[49]。



注：(A)兔杂交瘤技术；(B)基于展示文库的兔源抗体发现；(C)基于流式分选的单 B 细胞抗体发现；(D)基于液滴微流控技术的单 B 细胞抗体发现；(E)基于兔记忆 B 细胞体外激活与克隆技术的单 B 细胞抗体发现。单链可变区片段(single-chain variable fragment, scFv)；荧光激活细胞分选(fluorescence-activated cell sorting, FACS)；逆转录聚合酶链式反应(reverse transcription-polymerase chain reaction, RT-PCR)。

图 2 兔源单克隆抗体发现技术

Fig.2 Discovery technologies for rabbit-derived monoclonal antibodies

总体而言, 记忆 B 细胞体外激活与克隆技术兼具体内亲和力成熟与体外功能筛选的优势, 为获取高亲和力抗体提供了较为直接的路径, 适用于表位有限、对亲和力和特异性要求较高的小分子半抗原靶标。目前相关公开研究仍以蛋白抗原为主, 小分子靶标的系统性报道相对不足, 更多见于企业平台和专利成果。随着兔 B 细胞表面标志物、激活因子组合及培养体系的进一步优化, 该技术有望在抗小分子高亲和力兔源单克隆抗体获取中发挥更重要作用。

4　兔源抗小分子抗体在免疫检测中的应用

近年来, 兔源单克隆抗体已在 ELISA、侧流层析法(lateral flow immunoassay, LFIA)及生物传感器等平台获得应用, 典型靶标与性能参数汇总见表 2。总体来看, 相关研究普遍报告了较低的检出限、较高特异性以及在复杂基质中的可用性, 说明兔源单抗在小分子表位有限、对亲和力与选择性要求高的检测场景中具有一定优势。在 ELISA 方面, 兔源小分子单抗已用于动物源性食品中药物残留的定量分析。LIU 等[16]以通用磺胺半抗原构建免疫原并获得广谱抗磺胺兔单克隆抗体, 建立的竞争间接 ELISA 对磺胺噻唑的 IC_{50} 为 0.68 ng/mL, 对猪尿与牛奶样品的加标回收率分别为 92.6%~104.3%和 61.1%~81.6%。针对单靶标特异兔源抗体的研究亦有报道: 基于兔源杂交瘤获得的抗氯霉素高亲和力兔单克隆抗体, 用以建立的 ELISA 检出限可达 0.1 ng/mL, 并在猪尿、牛奶和蜂蜜等基质中表现出较好的加标回收率[50]; HUANG 等[51]制备了抗环丙沙星兔单克隆抗体, 并进一步建立了 ELISA, 其检出限低至 0.095 ng/mL, 同时交叉反应较低, 可满足限量值附近的检测需求。在 LFIA 方面, 兔源单克隆抗体常用于现场快速筛查。已有研究采用兔单克隆抗体作为识别元件建立磺胺类 LFIA, 实现牛奶和猪尿中多种磺胺残留的定量检测, 检测时间约 10~15 min, 其检出限与定量限指标优于多数基于小鼠单抗或多抗的试纸条方案[52]。除传统免疫检测外, 兔源小分子单抗亦可用于构建生物传感器。以氯霉素为例, 研究者利用兔源氯霉素抗体修饰电极构建电化学生物传感器, 线性检测范围覆盖监管限量水平, 检出限达亚 ng/mL 级, 提示其在快速预筛查面具有应用潜力[53]。

表 2　兔源抗小分子单克隆抗体在免疫检测中的应用实例

Table 2　Application examples of rabbit-derived anti-small molecule monoclonal antibodies in immunoassays

靶标	检测平台	关键性能	样本	文献
贻贝毒素	LFIA	IC_{50} 为 0.018 ng/mL; 截断值为 100 pg/mL	贻贝	[3]
莱克多巴胺	竞争 ELISA	检出限 0.0042~0.014 ng/mL	猪、羊、牛尿液	[4]
T2 毒素	竞争 ELISA	IC_{50} 为 0.089 ng/mL; 检出限为 0.32 μg/kg 到 1.42 μg/kg	牛奶、饲料和猪肉样品	[5]
磺胺类	竞争 ELISA	对磺胺噻唑的 IC_{50} 约 0.68 ng/mL, 检出限约 0.1 ng/mL	猪尿、牛奶	[16]
氯霉素	竞争 ELISA	IC_{50} 为 1.06 ng/mL, 检出限为 0.1 ng/mL, 线性范围 0.3~9 ng/mL	猪尿、牛奶、蜂蜜	[50]
环丙沙星	竞争 ELISA	检出限为 0.095 ng/mL; 对其他喹诺酮交叉反应极低	牛奶	[51]
玉米赤霉烯酮	竞争 ELISA	IC_{50} 约 90 ng/mL, 融合碱性磷酸酶后 IC_{50} 降至 14 ng/mL, 检出限约 2 ng/mL	玉米、小麦	[39]
三聚氰胺	竞争 ELISA	IC_{50} 分别为 12.64 和 10.32 μmol/L	奶粉、饲料	[40]
微囊藻毒素-LR	竞争 ELISA	检出限为 0.03~0.05 ng/mL	环境水样	[37]
氯霉素	电流型免疫传感器	检出限为 0.82 ng/mL	牛奶	[53]

综上, 兔源小分子单克隆抗体已在实验室定量检测、现场筛查、传感器检测等多层次体系中形成较为明确的应用。尽管其制备成本与工艺复杂度仍较高, 但随着单 B 细胞、体外克隆培养与重组表达等新技术的成熟, 兔源单抗的获取效率与一致性有望进一步提升, 从而推动其在食品安全与环境监测中的应用。

5　结束语

兔源抗小分子单克隆抗体在亲和力、表位分辨能力及复杂基质适应性方面具有一定的优势, 并已在兽药、农药、真菌毒素与环境污染物等多类靶标的免疫检测中得到应用。总体而言, 高质量抗体获取的前提在于半抗原设计与免疫程序的合理化, 以构建包含足够多高亲和力克隆的兔 B 细胞库; 在此基础上, 杂交瘤、展示文库、流式单 B 细胞、液滴微流控以及记忆 B 细胞体外激活与克隆等技术从不同环节提升了高亲和力克隆的发现效率, 并推动 ELISA、侧向层析及免疫传感器等检测平台的性能提升。与小鼠抗体相比, 兔抗更易形成深而窄的结合位点并实现精细的化学识别; 而人源抗体与纳米抗体在工程化改造方面更具便利性, 未来在小分子难靶标上更可能呈现优势互补的技术格局。

不同抗体发现平台各有侧重: 兔杂交瘤流程相对成熟, 但通量有限且依赖稳定融合细胞系; 展示文库便于体外筛选与工程化优化, 但高度依赖于文库质量, 且存在天

然重轻链配对被打散的问题；流式单 B 细胞与体外克隆培养更利于在天然配对背景下捕获体内已成熟的稀有克隆；液滴微流控则可在更大规模上实现功能导向筛选，并将功能检测与序列获取衔接。相较单一平台优劣的静态比较，更具可行性的策略是将各技术视为可组合模块，围绕优质免疫、抗原特异富集、功能筛选、序列获取、重组表达与优化构建连续化流程，以兼顾效率、特异性控制与可重复性。

目前，兔源小分子单抗发现技术仍存在若干瓶颈：高亲和力稀有 B 细胞的捕获效率仍有限；兔 BCR 扩增、表达与质控流程尚未完全标准化；针对小分子靶标的高通量功能筛选与交叉反应约束策略仍需进一步完善。后续可通过整合单细胞分选、液滴微流控、高通量测序与体外克隆培养，形成可复制的一体化发现平台，并引入结构建模与机器学习用于候选克隆的优先级排序、亲和力优化，同时推进质控指标与方法学标准的建立。综合技术成熟度与成本因素，兔源抗小分子单克隆抗体短期内更适合布局于严格限量监管、进出口贸易争议、环境应急与临床毒理等高附加值应用场景，常规大批量筛查则可采用成本更低的多克隆抗体或鼠单克隆抗体。随着关键流程向标准化、集成化与重组化演进，高亲和力兔源抗小分子单克隆抗体有望支撑兼具高灵敏度、强基质耐受性与经济性的下一代免疫检测体系。

参考文献

[1] SUN Q, DONG Y, WEN X, *et al.* A review on recent advances in mass spectrometry analysis of harmful contaminants in food [J]. Frontiers in Nutrition, 2023, 10: 1244459.

[2] LOUPPIS A, KONTOMINAS M. Recent developments (2020–23) on the use of lc in the determination of food contaminants [J]. Separations, 2024, 11(12): 342.

[3] WEI LN, LUO L, LI B, *et al.* Ultrasensitive “hunter of target”: Rabbit monoclonal antibody-based competitive lateral flow immunoassay for saxitoxin [J]. Analytical Chemistry, 2025, 97(2): 1410–1418.

[4] LI Y, LIU M, KONG Y, *et al.* Significantly improved detection performances of immunoassay for ractopamine in urine based on highly urea-tolerant rabbit monoclonal antibody [J]. Food and Chemical Toxicology, 2022, 168: 113358.

[5] LIANG LL, LONG JY, ZHANG XT, *et al.* Preparation of rabbit monoclonal antibody against t-2 toxin and development of enzyme-linked immunosorbent assay in milk, feed and pork samples [J]. Microchemical Journal, 2024, 207: 111977.

[6] DU K, HE H, ZHAO L, *et al.* Application of anti-immune complex reagents in small molecule analyte immunoassays [J]. Acs Omega, 2024, 9(46): 45688–45705.

[7] ZHANG X, LI Z, MAO Y, *et al.* Production of high-affinity monoclonal antibody and development of immunoassay for 3-methyl-quinoxaline-2-carboxylic acid detection in swine muscle and liver [J]. Food Chemistry, 2023, 407: 135175.

[8] CHEN Z, WANG G. Progress and perspectives of rabbit monoclonal antibodies [J]. Blood and Genomics, 2023, 7(1): 13–21.

[9] KUAI M, SHI Z, LI B, *et al.* Rabbit monoclonal antibodies: Synergistic innovation and breakthrough based on b-cell development mechanism and single b-cell technology [J]. Colloids and Surfaces B: Biointerfaces, 2026, 257: 115179. DOI:10.1016/J.COLSURFB.2025.115179

[10] ROS F, OFFNER S, KLOSTERMANN S, *et al.* Rabbits transgenic for human igg genes recapitulating rabbit b-cell biology to generate human antibodies of high specificity and affinity [J]. mAbs, 2020, 12(1): 1846900.

[11] LI Y, KONG Y, YU X, *et al.* Characteristics of rabbit hapten-specific and germline-based bcr repertoires following repeated immunization [J]. One Health Advances, 2023, 1(1): 17.

[12] PEDRIOLI A, OXENIUS A. Single B cell technologies for monoclonal antibody discovery [J]. Trends in Immunology, 2021, 42(12): 1143–1158.

[13] HAN KH, LI YC, PARVEEN R, *et al.* Technologies for monoclonal antibody discovery and development [J]. International Journal of Molecular Sciences, 2025, 26(21): 10470.

[14] FISCHER K, LULLA A, SO TY, *et al.* Rapid discovery of monoclonal antibodies by microfluidics-enabled facs of single pathogen-specific antibody-secreting cells [J]. Nature Biotechnology 2024, 43(6): 960–970.

[15] SHEMBEKAR N, HU H, EUSTACE D, *et al.* Single-cell droplet microfluidic screening for antibodies specifically binding to target cells [J]. Cell Reports, 2018, 22(8): 2206–2215.

[16] LIU N, HAN Z, LU L, *et al.* Development of a new rabbit monoclonal antibody and its based competitive indirect enzyme-linked immunosorbent assay for rapid detection of sulfonamides [J]. Journal of The Science of Food and Agriculture, 2013, 93(3): 667–673.

[17] LAVINDER JJ, HOI KH, REDDY ST, *et al.* Systematic characterization and comparative analysis of the rabbit immunoglobulin repertoire [J]. PLoS One, 2014, 9(6): e101322.

[18] WANG Y, QI Y, JIANG R, *et al.* Methods for small molecule artificial hapten synthesis: A review from an organic chemist's perspective [J]. Food Chemistry, 2025: 143991. DOI:10.1016/J.FOODCHEM.2025.143991.

[19] MARI GM, WU W, TALPUR A, *et al.* Hapten design to prepare monoclonal antibodies and establishment of immunoassay for direct screening of oxamichydrazide in chicken, the metabolite of nifuraldezone [J]. One Health Advances, 2023, 1(1): 6.

[20] LUO L, ZHANG Y, ZHAO X, *et al.* Rational hapten design, antibody preparation, and immunoassay development for rapid screening xylazine in biological samples [J]. Food Chemistry, 2025, 465: 142054.

[21] WU MF, XU N, LI S, *et al.* A hapten design strategy to enhance the selectivity of monoclonal antibodies against malachite green [J]. Frontiers in Sustainable Food Systems, 2024, 8: 1490750.

[22] CHEN M, QILENG A, LIANG H, *et al.* Advances in immunoassay-based strategies for mycotoxin detection in food: From single-mode immunosensors to dual-mode immunosensors [J]. Comprehensive Reviews in Food Science and Food Safety, 2023, 22(2): 1285–1311.

[23] SABRAN MR. Recent advances in immunoassay-based mycotoxin analysis and toxicogenomic technologies [J]. Journal of Food Safety and Quality, 2022, 30(4): 549.

[24] 王耀, 张改平, 胡骁飞, 等. 镰刀菌毒素及其人工抗原制备研究进展[J]. 中国公共卫生, 2011, 27(9): 1157–1159.
WANG Y, ZHANG GP, HU XF, *et al.* Recent advances in fusarium mycotoxins and artificial antigen preparation [J]. Chinese Journal of Public Health, 2011, 27(9): 1157–1159.

[25] 王炳志, 骆和东, 叶雅真, 等. 组胺胶体金免疫快速检测试纸条研制及其在水产品检测中的应用[J]. 食品安全质量检测学报, 2021, 12(18): 7206–7213.
WANG BZ, LUO HD, YE YZ, *et al.* Development of colloidal gold immunochromatographic assay for histamine and its application in aquatic products detection [J]. Journal of Food Safety & Quality, 2021, 12(18): 7206–7213.

[26] BURKIN MA, LITVINOVA VA, TIKHOMIROV AS, *et al.* Effect of carrier protein size on hapten immunogenicity and antibody affinity in mice [J]. Bioconjugate Chemistry, 2026, 37(1): 216–224.

[27] DEIMEL LP, MOYNIÉ L, SUN G, *et al.* Covalent penicillin-protein conjugates elicit anti-drug antibodies that are clonally and functionally restricted [J]. Nature Communications, 2024, 15(1): 6851.

[28] 王涛, 刘厦, 刘宝林, 等. 基于磁弛豫开关的免疫传感器检测自来水和脱脂牛奶中的雌二醇[J]. 食品安全质量检测学报, 2021, 12(8): 3287–3293.
WANG T, LIU S, LIU BL, *et al.* Detection of estradiol in tap water and skim milk by magnetic relaxation switch immunosensor [J]. Journal of Food Safety & Quality, 2021, 12(8): 3287–3293.

[29] 张莹蕾, 潘艳华, 方书灿, 等. 赭曲霉毒素 A 的抗原设计及在免疫分析中的应用[J]. 西华大学学报(自然科学版), 2021, 40(6): 97–102.
ZHANG YL, PAN YH, FANG SC, *et al.* Antigen design of ochratoxin a and its application in immunoassay [J]. Journal of Xihua University (Natural Science Edition), 2021, 40(6): 97–102.

[30] 邢云瑞, 姚静静, 邢广旭, 等. 环丙氨嗪完全抗原的合成及免疫原性鉴定[J]. 食品安全质量检测学报, 2018, 9(1): 68–73.
XING YR, YAO JJ, XING GX, *et al.* Synthesis and immunogenicity identification of cyromazine complete antigen [J]. Journal of Food Safety and Quality, 2018, 9(1): 68–73.

[31] 李楠, 王晓洁, 侯兰梅, 等. 不同合成方法对 4 种渔药人工抗原免疫原性的影响[J]. 食品安全质量检测学报, 2016, 7(4): 1535–1545.
LI N, WANG XJ, HOU LM, *et al.* Effects of different synthesis methods on immunogenicity of four fishery drug artificial antigens [J]. Journal of Food Safety & Quality, 2016, 7(4): 1535–1545.

[32] GUO H, YANG Y, ZHAO T, *et al.* Mechanism of a rabbit monoclonal antibody broadly neutralizing sars-cov-2 variants [J]. Communications Biology, 2023, 6(1): 364.

[33] SPIEKER-POLET H, SETHUPATHI P, YAM PC, *et al.* Rabbit monoclonal antibodies: Generating a fusion partner to produce rabbit-rabbit hybridomas [J]. Proceedings of The National Academy of Sciences, 1995, 92(20): 9348–9352.

[34] YAM PC, KNIGHT KL. Generation of rabbit monoclonal antibodies [M]. Monoclonal Antibodies: Methods and protocols. Springer. 2014.

[35] MORAES JZ, HAMAGUCHI B, BRAGGION C, *et al.* Hybridoma technology: Is it still useful? [J]. Current Research in Immunology, 2021, 2: 32–40.

[36] WEBER J, PENG H, RADER C. From rabbit antibody repertoires to rabbit monoclonal antibodies [J]. Experimental and Molecular Medicine, 2017, 49(3): e305.

[37] XU C, MIAO W, HE Y, *et al.* Construction of an immunized rabbit phage display antibody library for screening microcystin-lr high sensitive single-chain antibody [J]. International Journal of Biological Macromolecules, 2019, 123: 369–378.

[38] LEDSGAARD L, LJUNGARS A, RIMBAULT C, *et al.* Advances in antibody phage display technology [J]. Drug Discovery Today, 2022, 27(8): 2151–2169.

[39] SOMPUNGA P, PRUKSAMETANAN N, RANGNOI K, *et al.* Generation of human and rabbit recombinant antibodies for the detection of zearalenone by phage display antibody technology [J]. Talanta, 2019, 201: 397–405.

[40] HUANG A, LU T. Production of single-chain fv antibodies against melamine from a rabbit phage display library for the development of a melamine immunoassay [J]. Food Science and Biotechnology, 2011, 20(6): 1699–1704.

[41] SEEBER S, ROS F, THOREY I, *et al.* A robust high throughput platform to generate functional recombinant monoclonal antibodies using rabbit b cells from peripheral blood [J]. PLoS One, 2014, 9(2): e86184.

[42] 王战辉, 沈建忠, 温凯, 等. 单个记忆 B 细胞的筛选方法及其在小分子单克隆抗体制备中的应用: 中国, CN112266895B[P]. 2022-03-29.
WANG ZH, SHEN JZ, WEN K, *et al.* Method for screening single memory b cells and its application in the preparation of small-molecule monoclonal antibodies: CN112266895B [P]. 2022-03-29.

[43] GÉRARD A, WOOLFE A, MOTTET G, *et al.* High-throughput single-cell activity-based screening and sequencing of antibodies using droplet microfluidics [J]. Nature Biotechnology, 2020, 38(6): 715–721.

[44] SART S, RONTEIX G, JAIN S, *et al.* Cell culture in microfluidic droplets [J]. Chemical Reviews, 2022, 122(7): 7061–7096.

[45] MATUłA K, RIVELLO F, HUCK WT. Single-cell analysis using droplet microfluidics [J]. Advanced Biosystems, 2020, 4(1): 1900188.

[46] RUTKAUSKAITE J, BERGER S, STAVRAKIS S, *et al.* High-throughput single-cell antibody secretion quantification and enrichment using droplet microfluidics-based fret assay [J]. iScience, 2022, 25(7): 104515.

[47] DEJOUX A, ZHU Q, WOOLFE A, *et al.* Antibody-secreting cell repertoires hold high-affinity anti-rocuronium specificities that can induce anaphylaxis *in vivo* [J]. Journal of Allergy and Clinical Immunology, 2025, 155(5): 1557–1574.

[48] LI L, WEN Y, WRAPP D, *et al.* A novel humanized chi3l1 blocking antibody attenuates acetaminophen-induced liver injury in mice [J]. Antibody Therapeutics, 2023, 6(1): 1–12.

[49] ENDL J, SCHUHMACHER N, OFFNER S, *et al.* Single b-cell cultivation method: European, EP3239708B1 [P]. 2021-01-06.

[50] LIU N, SONG S, LU L, *et al.* A rabbit monoclonal antibody-based sensitive competitive indirect enzyme-linked immunoassay for rapid detection of chloramphenicol residue [J]. Food and Agricultural Immunology, 2014, 25(4): 523–534.

[51] HUANG B, YIN Y, LU L, *et al.* Preparation of high-affinity rabbit monoclonal antibodies for ciprofloxacin and development of an indirect competitive elisa for residues in milk [J]. Journal of Zhejiang University Science B, 2010, 11(10): 812–818.

[52] LIU N, NIE D, HAN Z, *et al.* Rabbit monoclonal antibody-based lateral flow immunoassay platform for sensitive quantitation of four sulfonamide residues in milk and swine urine[J]. Analytical Letters, 2013, 46(2): 286–298.

[53] HE G, YANG X, HU Y, *et al.* A sensitive and selective amperometric immunosensor for chloramphenicol detection based on magnetic nanocomposites modify screen-printed carbon electrode as a disposable platform [J]. International Journal of Electrochemical Science, 2014, 9(12): 6962–6974.

(责任编辑: 韩晓红　安香玉)