

## 利用单克隆抗体检测呋喃妥因代谢物海特因方法的研究

王烈喜, 陈黎斌, 姚玉静 (广东食品药品职业学院, 广东广州 510520)

**摘要** [目的] 建立敏感、快速、特异的呋喃妥因代谢物海特因的检测方法。[方法] 通过将间羧基苯甲醛和海特因的衍生物接种到牛血清白蛋白上免疫 Balb/C 小鼠, 应用杂交瘤技术制备单克隆抗体, 采用 ELISA 检测海特因的邻硝基苯甲醛衍生物。[结果] 采用 ELISA 检测海特因的邻硝基苯甲醛衍生物, 灵敏度达到 0.1 ng/ml。制备的单克隆抗体具有特异性高、灵敏的优点。[结论] 该研究可为酶联免疫试剂盒的研制奠定基础。**关键词** 呋喃妥因; 海特因; 单克隆抗体; 交叉反应

中图分类号 Q819; S851.34<sup>+</sup>7 文献标识码 A 文章编号 0517-6611(2015)03-159-04

## Study on the Detection Method of Nitrofurantoin Metabolite Aminohydantoin by Using Monoclonal Antibody

WANG Lie-xi, CHEN Li-bin, YAO Yu-jing (Guangdong Food and Drug Vocational College, Guangzhou, Guangdong 510520)

**Abstract** [Objective] The research aimed to establish a sensitive, rapid and specific method of detecting nitrofurantoin metabolite aminohydantoin. [Method] The derivatives of 3-carboxybenzaldehyde and aminohydantoin were inoculated with bovine serum albumin to immunize Balb/C mice. The monoclonal antibody was prepared by using hybridoma technique. The derivatives of 3-carboxybenzaldehyde and aminohydantoin of aminohydantoin was detected by using ELISA. [Result] The The derivatives of 3-carboxybenzaldehyde of aminohydantoin was detected by using ELISA, the sensitivity reached 0.1 ng/ml. The prepared monoclonal antibody had the advantages of high specificity and sensitivity. [Conclusion] The research could lay the foundation for the production of ELISA kits.

**Key words** Furantoin; Aminohydantoin; Monoclonal antibody; Cross reaction

硝基呋喃是人工合成的广谱抗生素, 由于价格低、效果好, 曾被广泛用于水产、畜禽的肠道传染病的预防和治疗<sup>[1]</sup>。硝基呋喃主要包括 4 种化合物: 呋喃唑酮、呋喃它酮、呋喃妥因和呋喃西林。呋喃妥因(Furantoin)又名呋喃坦啶(Furadantin), 对大肠杆菌、金葡萄、表葡萄、腐生葡萄球菌和肠球菌属均有抗菌作用<sup>[2]</sup>。20 世纪 90 年代发现硝基呋喃及其代谢物有致癌、致畸作用<sup>[3]</sup>, 世界各国开始禁止硝基呋喃的使用, 1995 年欧盟开始禁止硝基呋喃类药物在畜禽及水产动物食品中使用, 并严格执行对水产中硝基呋喃的残留检测, 2002 年美国亦随之制定相应法规。2002 年我国农业部第 193 号公告已经将其列入《食品动物禁用的兽药及其它化合物清单》中。目前, 世界各国食品监督机构所采用的标准是硝基呋喃类代谢产物不得检出, 检测低限为 1 μg/ml。

硝基呋喃进入体内后迅速代谢, 难以检测, 而形成的代谢物与蛋白质结合稳定, 可以保存数周<sup>[4]</sup>。目前, 国际上通行的方法是检测动物组织中的硝基呋喃代谢物残留。呋喃唑酮(Furazolidone)、呋喃它酮(Furaltadone)、呋喃妥因(Nitrofurantoin)、呋喃西林(Nitrofurazone)的代谢产物分别为 AOZ、AMAZ、AHD、SEM。为了建立敏感、快速、特异的呋喃妥因代谢物海特因的检测方法, 笔者通过将间羧基苯甲醛跟海特因的衍生物接种到牛血清白蛋白上免疫 Balb/C 小鼠, 应用杂交瘤技术制备单克隆抗体, 以期酶联免疫试剂盒的研制奠定了基础。

## 1 材料与方 法

**1.1 材料** 呋喃妥因、海特因盐酸盐, 购自山东方兴科技有限公司; 邻硝基苯甲醛, 购自 Acros; 间羧基苯甲醛购自 Fluka; 吡啶、二甲亚砜、乙酸乙酯、盐酸、无水硫酸钠、二甲基甲

酰胺、碳酸氢钠、四硼酸钠、硼酸、磷酸二氢钠、磷酸氢二钠、Tween-20、碳酸钠均购自深圳化试科技有限公司, 均为分析纯; N-甲基吗啉和氯甲酸异丁酯均购自国药集团; 牛血清白蛋白、卵清蛋白、HEPES, 均购自上海生工; RPMI 1640 和胎牛血清为 Gibco 产品, 购自广州威佳科技有限公司; HT、HAT、福氏完全佐剂、福氏不完全佐剂, 均为 Sigma 产品, 购自广州宝泰克生物科技有限公司; 呋喃唑酮的代谢物 AOZ、均呋喃西林的代谢物 SEM、呋喃它酮的代谢物 AMAZ, 均购自 Sigma; Balb/c 小鼠购自南方医科大学实验动物中心; 小鼠骨髓瘤细胞 Sp2/0 由南方医科大学基础部免疫教研室惠赠; Costar 酶标板为 Corning 公司产品; 羊抗鼠 IgG-HRP、显色剂购自晶美生物工程有限公司; SPA-Sephrose 购自本元正阳基因技术有限公司。

**1.2 仪器与设备** 磁力搅拌器、旋转蒸发仪、二氧化碳培养箱、超净工作台、倒置显微镜、雷杜酶标仪、雷杜洗板机、TGL-16C 台式高速离心机、TDL-40C 低速离心机, 紫外可见分光光度计、电子天平(感量 1 mg)、pH 计(伏特 pH510 型, 测量精度 0.02)、移液枪(10~100 μl、20~200 μl、10~1000 μl 单道, 300 μl 八道)。

## 1.3 方法

**1.3.1 间羧基苯甲醛与海特因衍生物(A)的制备。** 50 mg 间羧基苯甲醛, 151 mg 海特因盐酸盐, 7 ml 吡啶, 加入 25 ml 圆底烧瓶中, 回流过夜, 蒸干吡啶, 加入 6 ml 水, 用 1 mol/L HCl 调节 pH 至 1~2, 过滤收集沉淀, 水洗, 干燥, 得到灰白色固体 72 mg。MS 为 (M-H)<sup>-</sup>, 246.1。

**1.3.2 邻硝基苯甲醛与海特因衍生物(B)的制备。** 0.756 g 5 mmol 邻硝基苯甲醛, 溶于 10 ml 二甲亚砜, 加入 0.909 g 6 mmol 海特因盐酸盐, 室温下搅拌 5 h, 然后加入 60 ml 1 mol/L HCl, 用 2×50 ml 乙酸乙酯提取, 无水硫酸钠干燥, 蒸干溶剂, 得到 1.14 g 固体产物。MS: M<sup>+</sup>H<sup>+</sup>, 249.2; M<sup>+</sup>Na<sup>+</sup>, 271.3。

**基金项目** 广东食品药品职业学院校级项目(301009A1203)。

**作者简介** 王烈喜(1981-), 男, 江西泰和人, 讲师, 硕士, 从事农产品检测研究。

**收稿日期** 2014-12-09

**1.3.3 海特因衍生物 A 与蛋白质的偶联。**采用混合酸酐法,上述制备的海特因衍生物 A 18.6 mg,溶于 1.8 ml 二甲基甲酰胺,冰水冷却下加入 21  $\mu\text{l}$  N-甲基吗啡啉,18  $\mu\text{l}$  氯甲酸异丁酯。冰水冷却下反应 30 min。

称取 60 mg 牛血清白蛋白,溶于 3 ml 0.1 mol/L, pH9.0 的硼酸缓冲液,加入 1.6 ml 二甲基甲酰胺,滴加上述混合酸酐液 1.2 ml, 4  $^{\circ}\text{C}$  下反应过夜,对 PBS 透析 2 d,换液 6 次,在波长 200~360 nm 处进行紫外吸收扫描, -20  $^{\circ}\text{C}$  冻存。

称取 30 mg 卵清蛋白,溶于 1.5 ml 0.1 mol/L, pH9.0 的硼酸缓冲液,加入 0.8 ml 二甲基甲酰胺,滴加上述混合酸酐液 0.6 ml, 4  $^{\circ}\text{C}$  下反应过夜,对 PBS 透析 2 d,换液 6 次。离心去除反应中生成的沉淀,在波长 200~360 nm 处进行紫外吸收扫描, -20  $^{\circ}\text{C}$  下冻存。

**1.3.4 小鼠的免疫。**海特因衍生物 A 与牛血清白蛋白的偶联物稀释成蛋白含量 2 mg/ml,与福氏佐剂 1:1 (v/v) 用注射器乳化,每只小鼠皮下注射 100  $\mu\text{l}$ ,第 1 次用福氏完全佐剂,然后再用福氏不完全佐剂。每隔 3 周加强免疫 1 次,共免疫 5 次。

**1.3.5 小鼠滴度和抗体竞争试验。**取“1.3.3”中制备的卵清蛋白偶联物,用包被缓冲液(0.05 mol/L 碳酸缓冲液, pH9.5)稀释 2 000 倍,加入酶标板中,每孔 100  $\mu\text{l}$ , 4  $^{\circ}\text{C}$  包被过夜。倒去孔中液体,用洗涤液(0.05% Tween-20, 10 mmol/L 磷酸缓冲液, 0.15 mol/L NaCl, pH7.4)配制的 3% 的脱脂奶粉 37  $^{\circ}\text{C}$  下封闭 1 h,用洗涤液洗板 5 次。小鼠第 5 次免疫后 12 d 剪尾采血,血液 37  $^{\circ}\text{C}$  放置 2 h, 4  $^{\circ}\text{C}$  过夜,离心分离血清。血清用洗涤液稀释 1 000 倍、10 000 倍等适当倍数,加到上述包被的酶标板中,每孔 100  $\mu\text{l}$ , 37  $^{\circ}\text{C}$  孵育 40 min。洗板 5 次,加入羊抗鼠 IgG-HRP, 37  $^{\circ}\text{C}$  孵育 40 min,洗板 5 次,加入 TMB 底物 100  $\mu\text{l}$ , 37  $^{\circ}\text{C}$  下显色 15 min,加入终止液(2 mol/L 硫酸)50  $\mu\text{l}$ ,使用酶标仪测定 450 nm 的吸光值。

邻硝基苯甲醛与海特因衍生物(B)对抗体的竞争试验,根据上述测定的滴度,取吸光值 1.5 左右的血清稀释倍数,稀释此倍数的一半,每孔加入 50  $\mu\text{l}$  血清稀释液,50  $\mu\text{l}$  B 的溶液(B 先用甲醇配成 500  $\mu\text{g}/\text{ml}$ ,然后用洗涤液稀释成 0、0.2、2.0、20.0  $\mu\text{g}/\text{ml}$ ),同上进行 ELISA 反应,测定每个浓度对空白的抑制百分数。

**1.3.6 细胞融合和单克隆抗体的制备**<sup>[5]</sup>。取滴度高、竞争力好的 2 号鼠,融合前 3 d 尾静脉注射 50  $\mu\text{g}$  免疫原,取脾跟骨髓瘤细胞 SP2/0 融合,通过融合、ELISA 筛选、有限稀释法克隆,得到 8 株单克隆细胞株,取细胞株的培养上清如上进行滴度和竞争试验(邻硝基苯甲醛海特因衍生物 B 配制成 1、2 和 10 ng/ml),对筛选到克隆进行冻存、复苏,多次克隆试验,以检验细胞株的稳定性。

**1.3.7 腹水的制备和单克隆抗体的纯化。**取 10 只母 Balb/c 鼠,每只注射降值烷 0.5 ml, 7~14 d 后注射单克隆细胞 0.5 ml,含  $2 \times 10^6$  个细胞,7 d 后适时处死小鼠,抽取腹水,离心去脂后 -20  $^{\circ}\text{C}$  冻存。抗体用 SPA-Sepharose 纯化,按照说明书进行。

**1.3.8 ELISA 试剂盒条件的摸索。**取“1.3.3”制备的卵清

蛋白偶联物,用包被缓冲液稀释 1 000、2 000、4 000 和 8 000 倍,加入 Costar 酶标板中,每孔 100  $\mu\text{l}$ , 4  $^{\circ}\text{C}$  下包被过夜,第 2 天弃掉包被液,用含 1% BSA 的洗涤液 37  $^{\circ}\text{C}$  封闭 1 h,洗板 5 次。板中加入 1 mg/ml 的单克隆抗体稀释液,抗体用洗涤液稀释 1 000、2 000、4 000 和 8 000 倍,用包被的板按照 ELISA 程序进行 Check board 分析,选取光吸收值在 1.5 左右的组合,作为包被物和抗体的稀释浓度。在此条件下制成的板,用适当浓度的邻硝基苯甲醛海特因衍生物进行竞争试验,绘制出标准曲线和测定试剂盒的灵敏度。

**1.3.9 硝基咪喃代谢物的衍生。**硝基咪喃药物咪喃唑酮代谢物 AOZ、咪喃它酮代谢物 AMOZ、咪喃妥因代谢物 AHD、咪喃西林代谢物 SEM 用水溶解,配制成 10  $\mu\text{g}/\text{ml}$ ,然后用水稀释成适当浓度。称取邻硝基苯甲醛 15.1 mg,加入甲醇 10 ml,配制成 10 mmol/L。1 ml 硝基咪喃代谢物,加入 4 ml 水、0.25 ml 2 mol/L HCl 和 100  $\mu\text{l}$  邻硝基苯甲醛衍生试剂, 37  $^{\circ}\text{C}$  过夜孵育。加入 5 ml 0.1 mol/L  $\text{K}_2\text{HPO}_4$ , 0.4 ml 1 mol/L NaOH, 5 ml 乙酸乙酯,振荡 1 min,取出 2.5 ml 乙酸乙酯, 50  $^{\circ}\text{C}$  下旋转蒸干或氮气吹干,加入 1 ml 0.01 mol/L PBS 溶解,取 50  $\mu\text{l}$  进行 ELISA 检测,稀释倍数为 2。

**1.3.10 交叉反应试验。**与以上海特因邻硝基苯甲醛的衍生物的竞争试验一样,按照“1.3.8”中方法将 AMOZ、AHD 和 SEM 衍生,然后按照 ELISA 程序,将衍生物溶液加到已包被有卵清蛋白偶联物的酶标板孔中,每孔 50  $\mu\text{l}$ ,稀释抗体 50  $\mu\text{l}$ ,经过孵育、洗涤、加入二抗、洗涤、显色等步骤,计算出与空白相比抑制吸收值 50% 的  $IC_{50}$ ,利用海特因的  $IC_{50}$ ,计算出它们的交叉反应性 CR 值(海特因邻硝基苯甲醛的衍生物  $IC_{50}$ /测试的物质的  $IC_{50} \times 100$ )。

## 2 结果与分析

**2.1 免疫原的制备** 由于咪喃妥因的代谢物海特因(AHD)的分子量很小,不太适宜作为半抗原,进行质谱分析时背景噪音较大。检测硝基咪喃代谢物一般先使邻硝基苯甲醛和海特因反应,然后检测它们的衍生物<sup>[6]</sup>(图 1)。邻硝基苯甲

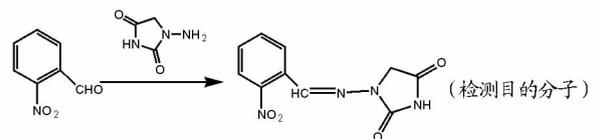


图 1 邻硝基苯甲醛和海特因的衍生物

醛海特因衍生物没有可以直接跟蛋白质连接的基团,笔者先用间羧基苯甲醛跟海特因在吡啶中结合(图 2),制作分子结构类似物<sup>[7]</sup>。经过质谱鉴定得到间羧基苯甲醛跟海特因的衍生物(图 3)。利用混合酸酐法,将它的羧基与牛血清白蛋白的氨基相联制备免疫原,与卵清蛋白相联制备筛选抗原。从紫外吸收光谱上可以看出,蛋白偶联前后发生了很大变化(图 4)。

**2.2 单克隆的制备** 小鼠免疫 5 次后,用间羧基苯甲醛海特因衍生物 A 与 OVA 的偶联物稀释 2000 倍包被酶标板,测定其滴度。

根据上面的滴度参数,以 1、2 号鼠的血清稀释 50 000

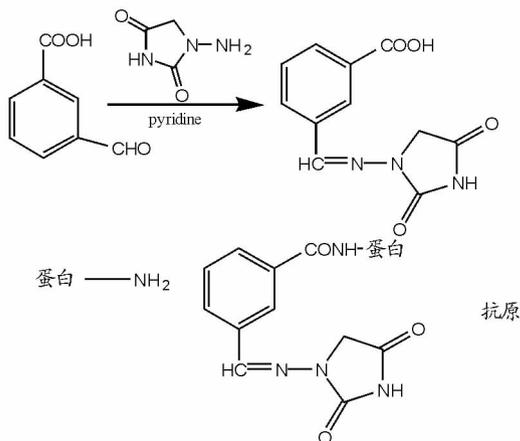


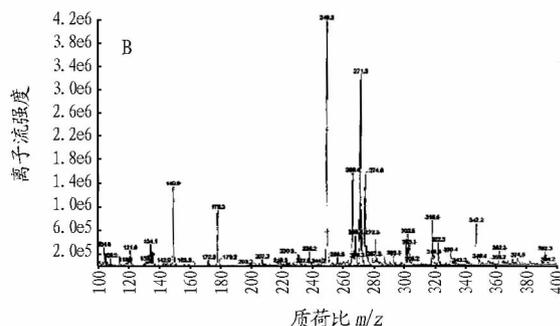
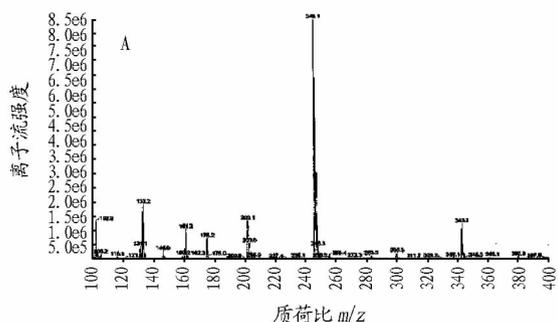
图2 蛋白与 AHD 的偶联物的合成

倍,3、4、5 号鼠的血清稀释 25 000 倍,进行邻硝基苯甲醛海特因衍生物 B 的竞争试验。

表1 间羧基苯甲醛海特因衍生物 A 与 OVA 的偶联物包被酶标板测定结果

鼠号	血清稀释下列倍数的 ELISA 光吸收			
	10 000	50 000	100 000	200 000
1	1.776	1.626	1.475	0.144
2	1.729	1.717	1.524	0.832
3	1.735	1.427	0.754	0.102
4	1.695	1.355	0.694	0.098
5	1.770	1.244	0.566	0.096

从表 2 可以看出,加入邻硝基苯甲醛海特因后,抑制了抗体跟酶标板上的偶联物的结合,证明抗体能跟邻硝基苯甲醛海特因结合。选取滴度高、竞争相对较好的 2 号鼠进行融合,融合后得到 8 个滴度高的克隆 A001 ~ A008(表 3)。



注:A. 羧基苯甲醛与海特因的衍生物;B. 邻硝基苯甲醛和海特因的衍生物。

图3 AHD 衍生物的质谱碎片分析

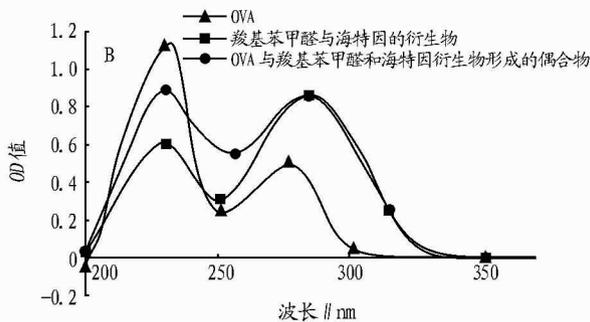
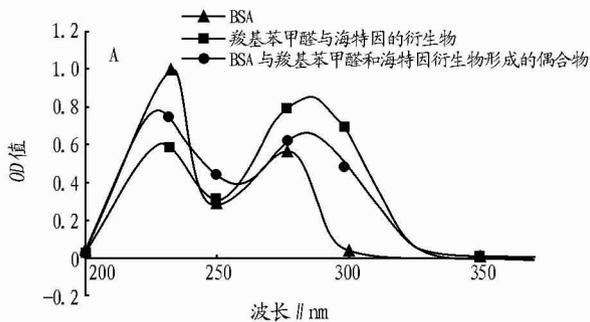


图4 紫外吸收光谱

表2 邻硝基苯甲醛海特因衍生物 B 的竞争试验结果

鼠号	邻硝基苯甲醛海特因衍生物的浓度// $\mu\text{g}/\text{ml}$			
	0	0.2	2.0	20.0
1	1.442	1.038	0.570	0.098
2	1.517	0.912	0.365	0.079
3	1.347	1.120	0.533	0.230
4	1.278	1.110	0.642	0.154
5	1.159	0.877	0.412	0.122

表3 小鼠融合后克隆竞争试验结果

克隆号	培养上清稀释倍数	邻硝基苯甲醛海特因衍生物的浓度// $\text{ng}/\text{ml}$	
		0	20
1	400	1.235	0.332
2	400	1.654	0.454
3	400	0.987	0.244
4	800	1.221	0.772
5	400	1.335	0.423
6	800	1.052	0.234
7	800	1.344	0.098
8	400	1.443	0.655

选取 7 号克隆,小鼠腹腔注射杂交瘤细胞,7 d 后适当时间收集腹水,用 SPA 亲和层析柱纯化,所得抗体用来制备酶联免疫试剂盒。

2.3 标准曲线 采用间接法,在酶标板上包被海特因衍生

物的卵清蛋白偶联物,加入抗体、不同浓度的标准溶液或者

样品敷育,洗板后加入 HRP 标记的羊抗鼠 IgG。经洗涤,加底物显色后,2 mol/L 硫酸终止,测定 450 nm 处光吸收值。利用 Check board 法,确定最适包被偶联物和抗体的浓度,以百分吸光度对 AHD 浓度的对数作图,绘制标准曲线(图 5),其中百分吸光度值的计算公式如下:

$$\text{百分吸光度值}(\%) = (B/B_0) \times 100$$

式中, $B$  为标准溶液或样本溶液的平均吸光度值; $B_0$  为 0 ng/ml 标准溶液的平均吸光度值。

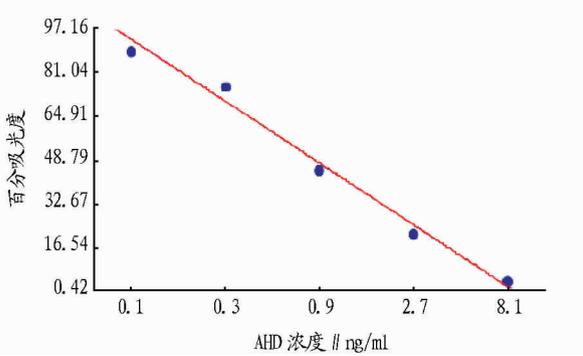


图 5 呋喃妥因代谢物的酶免疫试剂盒的标准曲线

**2.4 交叉反应性** 1 个好的抗体要求其特异性要好。测定了 A007 号抗体和呋喃唑酮的代谢物 AOZ、呋喃它酮的代谢物 AMOZ、呋喃西林的代谢物 SEM 的交叉反应性,先将代谢物用邻硝基苯甲醛进行衍生,然后测定半数抑制浓度  $IC_{50}$ ,发现交叉反应性均少于 0.1% (表 4)。

表 4 抗体与呋喃妥因及其他硝基呋喃代谢物的交叉反应

品名	$IC_{50}$ / ng/ml	交叉反应性 (CR, %)
海特因	0.9	100
AOZ	> 1 000	< 0.1
AMOZ	> 1 000	< 0.1
SEM	> 1 000	< 0.1

### 3 讨论

作为完全抗原其分子结构上需要同时具备 T 细胞和 B

细胞表位,小分子物质结构简单,难以同时具有这 2 种表位,需先将它接种到载体蛋白上,借助载体蛋白的 T 细胞表位间接诱导 B 细胞的活化、增值,才能诱导产生针对小分子半抗原的抗体。常用的载体蛋白有铜蓝蛋白、牛血清白蛋白、卵清蛋白、人血清白蛋白、结核杆菌毒素蛋白和人工合成的多抗原肽系统。

蛋白质上常用来连接小分子的基团有氨基、羧基、巯基、酪氨酸的苯环等。小分子与蛋白质相连的位置、臂长等直接影响抗体对小分子的亲合力。邻硝基苯甲醛和海特因的衍生物没有直接连接到蛋白质上的基团,利用间羧基苯甲醛与海特因的衍生物上的羧基跟蛋白质上的氨基相连,虽然苯环上少了 1 个硝基,多了 1 个羧基,但作出的抗体跟邻硝基苯甲醛和海特因的衍生物仍有很强的亲和力。ELISA 检测结果可以精确到 0.1 ng/ml。

单克隆抗体具有结构均一、重复性好、细胞株可以冷冻保存、易于生产的优点。该研究制备的单抗具有特异性高、灵敏的优点,可为开发 ELISA 酶联检测试剂盒以及方便、快速检测呋喃妥因残留奠定了基础。

### 参考文献

- [1] 傅国, 李宁毅. 硝基呋喃类和硝基咪唑类的研究进展[J]. 青岛大学医学院学报, 2003, 39(4): 486-488.
- [2] MCOSKER C C, FITZPATRICK P M. Nitrofurantoin: mechanism of action and implications for resistance development in common uropathogens[J]. J Antimicrob Chemother, 1994, 33(SA): 23.
- [3] ASIM K D, CORWIN H. Mechanistic interpretation of the geno-toxicity of nitrofurans using quantitative structure-activity relationship and comparative molecular field analysis[J]. J Med Chem, 1993, 36: 1007.
- [4] VROOMEN L H M, BERGHMANS M C J, VAN LEEUWEN P, et al. Kinetics of 14C-furazolidone in piglets upon oral administration during 10 days and its interaction with tissue macromolecules[J]. Food Addit Contam, 1986, 3: 331-346.
- [5] HEDDY ZOLA. 单克隆抗体手册[M]. 周宗安, 等, 译. 南京: 南京大学出版社, 1991: 48-63.
- [6] 郭德华, 汪国权, 王东辉, 等. 高效液相色谱-串联质谱法测定动物源性食品中硝基呋喃类代谢物残留量[J]. 化学分析计量, 2005, 14(4): 16-18.
- [7] VASS M, KOTKOVA L, DIBLIKOVA I, et al. Production and characterisation of monoclonal antibodies for the detection of AOZ, a tissue bound metabolite of furazolidone[J]. Vet Med Czech, 2005, 50(7): 300-310.
- [8] ROBYN L, HOWITT J. Genome characterization of Botrytis virus F, a flexuous rod-shaped mycovirus resembling plant 'potex-like' viruses[J]. Journal of Neel Virology, 2000, 82: 67-78.
- [9] ENEBAK S A, HILLMAN B L, MACDONALD W L. A hypovirulent isolate of *Cryphonectria parasitica* with multiple, genetically unique dsRNA segments[J]. The American Phytopathological Society, 1994, 7(5): 590-595.
- [10] 林玲, 乔勇升, 顾本康, 等. 植物内生细菌及其生物防治植物病害的研究进展[J]. 江苏农业学报, 2008(6): 102-109.
- [11] LI G Q, HUANG H C, MIAO H J, et al. Biological control of sclerotinia diseases of rapeseed by aerial applications of the mycoparasite *Coniothyrium minitans*[J]. European Journal of Plant Pathology, 2006, 114(4): 354-365.
- [12] 谢联辉. 21 世纪我国植物保护问题的若干思考[J]. 中国农业科技导报, 2003, 5(5): 5-7.
- [13] 施跃峰. 试论生物农药产业及其在我国的发展策略[J]. 安徽农学通报, 2004(4): 85-89.
- [14] 田波, 龚祖焜. 病毒与农业[M]. 北京: 科学出版社, 1996: 245-258.

(上接第 132 页)