

脱氧雪腐镰刀菌烯醇 ELISA 定量检测试剂盒的研制*

何庆华, 许 杨, 刘仁荣, 邓舜洲

(南昌大学食品科学与技术国家重点实验室, 中德联合研究院, 江西 南昌, 330029)

摘 要 研制了脱氧雪腐镰刀菌烯醇 ELISA 试剂盒, 用于检测谷物粮食中的脱氧雪腐镰刀菌烯醇(Deoxynivalenol, DON)。在抗 DON 单克隆抗体的基础上, 用间接竞争酶联免疫吸附检测试剂盒各项指标。结果为: 试剂盒最低检测浓度为 20 ng/mL, 检测线性范围为 50~400 ng/mL, IC_{50} 103 ng/mL。平均加标回收率 > 80%, 批内变异系数小于 10%, 批间变异系数 < 15%。用试剂盒测定盲样, 其结果与德国拜发试剂盒及免疫亲和柱-高效液相色谱检测结果无显著性差异。说明试剂盒指标符合相关技术要求, 具有快速、灵敏、准确、方便等特点。

关键词 脱氧雪腐镰刀菌烯醇, ELISA, 试剂盒

脱氧雪腐镰刀菌烯醇(deoxynivalenol, DON)是一种常见的真菌毒素, 主要由禾谷镰刀菌产生, 污染小麦、大麦及玉米等谷物及其制品, 具有免疫毒性、急性毒性及胚胎毒性等^[1~3]。由于 DON 在谷物中的高污染率及对人和家畜的高度危害, 目前国内外对 DON 均制定了限量标准。目前检测 DON 的方法主要有薄层色谱法、高效液相色谱法、气相色谱法及酶联免疫吸附法(enzyme linked immunosorbent assay, ELISA)。其中 ELISA 法具有成本低, 灵敏度高, 可高通量检测等优点, 国内外均采用此方法对样品进行大规模筛选普查。

本研究旨在前期获得抗 DON 单克隆抗体的基础上, 研究开发 DON ELISA 定量快速检测试剂盒以打破国外的技术垄断, 为我国粮食谷物中 DON 污染状况的调查提供技术支持。

1 材料和方法

1.1 仪器

CO₂ 培养箱(美国 SL 公司); 洁净工作台(北京半导体设备厂); 倒置光学显微镜(LEITZ); 酶标分析仪(美国 Thermo 公司); 八管可调移液器(芬兰 Lab-systems 公司); 恒温孵育箱(日本 SANYO); 高效液相色谱仪(Agilent 1100)。

1.2 试剂

脱氧雪腐镰刀菌烯醇标准品(Sigma 公司); 牛血清白蛋白(上海生工); 抗 DON 单克隆抗体(本实验

室自制); DON-BSA 全抗原(本实验室自制); TMB 单组份显色液(美国 Amresco); 酶标板(美国 Costar); 羊抗小鼠 HRP 酶标记 IgG (Sigma 公司); DON ELISA 试剂盒(德国 Biopharm); 脱氧雪腐镰刀菌烯醇酶免疫亲和柱(美国 VICAM)。

1.3 溶液系统

(1) 包被液: 0.01 mol/L 磷酸缓冲液(PBS), pH7.2。(2) 洗涤液: PBS-T, 含 0.05% Tween-20 的 0.01 mol/L 磷酸缓冲液(V/V)。(3) 终止液: 2 mol/L H₂SO₄。(4) 抗体: 抗 DON 单克隆抗体。(5) 抗体稀释液: 含 1% 牛血清白蛋白(W/V)的 0.01 mol/L 磷酸缓冲液。(6) DON 标准品液: 用超纯水将 DON 标准品稀释成 0、50、100、200、400 ng/mL, 4℃ 保存。(7) 酶标记二抗稀释液: 含 1% 牛血清白蛋白(W/V)的 0.01 mol/L 磷酸缓冲液。(8) 酶标记二抗: 取酶标记二抗稀释液, 将羊抗小鼠 HRP 酶标记 IgG 稀释成 1:3 000。

1.4 方法

1.4.1 DON-BSA 抗原的合成及抗 DON 单克隆抗体的制备

制备方法见参考文献^[4,5]。

1.4.2 包被及板条处理

用 0.01 mol/L 磷酸缓冲液(PBS), pH7.2 将 DON-BSA 抗原溶解后, 100 μL/孔包被于酶标板中, 4℃ 过夜。取出包被好板条, 甩掉包被抗原, 洗涤液洗板 4 次。3% 脱脂牛奶(W/V), 300 μL/孔, 37℃ 封闭 1 h。甩掉封闭液, 洗涤液洗板 4 次, 吹干, 抽真空干燥保存于 4℃ 冰箱。

1.4.3 样品提取

准确称取 5 g 已充分粉碎的待测样品, 加入 25

第一作者: 硕士, 助理研究员(许杨为通讯作者)。

* 国家 863 高技术研究发展计划项目(No. 2007AA10Z427)

收稿日期: 2008-05-30

mL 超纯水,充分振荡 3 min,过滤。取滤液 4 mL,加 4 mL 超纯水混匀,再过滤,滤液即为样品提取液。

1.4.4 检测步骤

(1)按顺序依次加入 0、50、100、200、400 ng/mL 浓度 DON 标准品及样品提取液 50 μ L/孔,再加入 50 μ L/孔抗 DON 单克隆抗体,水平方向轻轻混匀,37 $^{\circ}$ C 温育 30 mins。(2)取出温育后板条,甩掉孔中液,洗涤液洗板 4 次,拍干,加入 100 μ L/孔 酶标记二抗,37 $^{\circ}$ C 温育 30 mins。(3)同上洗板 4 次,加入 100 μ L/孔 TMB 显色液,37 $^{\circ}$ C 避光显色 5 mins。(4)加入 50 μ L/孔 终止液,酶标仪读数。

1.4.5 试剂盒技术参数研究

1.4.5.1 标准曲线及 IC₅₀ 的确定

以所配制的各浓度标准品按检测步骤提及方法进行测定,获得的各标准品的吸光值除以 0 浓度标准品的吸光值再乘以 100,得出百分比值 $[(B/B_0)\%]$ 。以各标准品浓度的常用对数值(lgC)为横坐标, $B/B_0\%$ 值为纵坐标绘制一个对应 DON 浓度的半对数坐标曲线图。从标准曲线中查出 $(B/B_0)\%$ 为 50%时对应的 DON 浓度为 IC₅₀。

1.4.5.2 加标回收率及批内、批间变异系数的测定

在空白样品中(玉米粉)添加国家标准最高允许量(1 000 μ g/kg)的上下 2 个浓度的标准品(800、2 400 μ g/kg);提取样品后,用 1.4.4 方法进行测定,每个添加浓度测定 6 个平行样,并进行 3 批次实验(不同检测日期、不同标准曲线、不同批次试剂盒)。批内变异系数:同一批次,平行样之间的变异系数。批间变异系数:不同批次测定样品之间的变异系数值。

1.4.5.3 与国外试剂盒及免疫亲和柱-高效液相色谱法进行确证

取 16 份盲样(大米、小麦和玉米样本各若干份),

分别用自研 DON ELISA 定量检测试剂盒(16 份盲样)、德国拜发公司产 DON 试剂盒(8 份盲样)、免疫亲和柱-高效液相色谱(8 份盲样)检测进行测定。

1.4.5.4 试剂盒稳定性试验

对试剂盒稳定性采用 37 $^{\circ}$ C 加速破坏试验进行研究,将试剂盒同时置于 4 $^{\circ}$ C 和 37 $^{\circ}$ C 中,每隔 24 h 进行 ELISA 测定。测定阴性对照(B_0 , 0 ng/mL)和阳性对照(50%毒素抑制浓度 B)的 OD 值,计算两者的比值(B/B_0),当 $B_0 < 0.6$ 时,或 $B/B_0 > 0.7$ 时,即可判定试剂盒失效。

2 结果

2.1 抗原包被浓度及抗体工作液浓度

经棋盘滴定,确定抗体最佳工作浓度为 1 : 2.0 $\times 10^4$,DON-BSA 抗原包被浓度为 2 μ g/mL。

2.2 标准曲线、IC₅₀ 和检测限

用 DON 标准品溶液(0、50、100、200、400 ng/mL)做间接竞争 ELISA 标准曲线,每个浓度做 2 个平行孔,连续重复 3 次,用德国拜发公司 RIDAWIN ELISA 软件制得标准曲线如图 1。检测范围为:50~400 ng/mL,IC₅₀ 103 ng/mL,检测限 20 ng/mL。

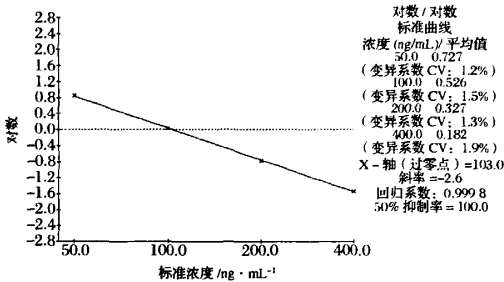


图 1 DON 间接竞争 ELISA 标准曲线

2.3 加标回收率及批内、批间变异系数(表 1)

表 1 加标回收率及批内、批间变异系数 %

加标浓度 / μ g · kg ⁻¹	批次 1(n=6)		批次 2(n=6)		批次 3(n=6)		批间变异系数
	平均回收率	cv	平均回收率	cv	平均回收率	cv	
800	87.2	7.5	92.1	2.5	110.0	1.5	13.0
2400	83.3	6.1	88.4	5.3	89.7	4.1	8.3

2.4 盲样测定及方法确证

与德国拜发公司试剂盒检测盲样结果比对见表 2,与免疫亲和柱-高效液相色谱检测盲样结果比对见表 3。

2.5 稳定性

经过 37 $^{\circ}$ C 加速破坏试验,0~72 h 内,OD 值均无

明显下降,且 B/B_0 均小于 0.7。72~120 h 内,OD 值随时间延长而下降,但 B_0 值均 > 0.6 , $B/B_0 < 0.7$ 。168 h 后 $B_0 < 0.6$ 。

表 2 试剂盒检测盲样比对结果

样品编号	自研试剂盒测定结果 / $\mu\text{g} \cdot \text{kg}^{-1}$	德国拜发试剂盒测定结果 / $\mu\text{g} \cdot \text{kg}^{-1}$
1	77.4	78.7
2	未检出	未检出
3	895.0	987.3
4	未检出	未检出
5	1 281.7	1 560.7
6	190.4	240.8
7	2 346.2	2 134.4
8	未检出	未检出

表 3 试剂盒与高效液相色谱检测盲样比对结果

样品	自研试剂盒测定结果 / $\mu\text{g} \cdot \text{kg}^{-1}$	免疫亲和柱-高效液相 色谱测定结果/ $\mu\text{g} \cdot \text{kg}^{-1}$
9	222.0	186.4
10	889.3	719.0
11	1 541.3	1 147.8
12	544.0	512.3
13	1 491.0	1 137.5
14	1 149.0	904.8
15	763.3	650.0
16	1 237.6	1 100.6

3 讨 论

随着国家对食品安全的逐步重视,ELISA 在农药、兽药残留、生物毒素、毒品及真菌毒素等检测领域的应用越来越广泛,这就对 ELISA 的准确度和重复性提出了更高的要求,必须研究开发出能够经得起实际检验的 ELISA 试剂盒。

本研究在前期获得抗 DON 单克隆抗体的基础上,对 ELISA 法检测谷物及其制品中的 DON 进行了优化。首先,在样品提取过程中,采用超纯水提取,逐步稀释,2 次过滤的方法,避免使用有机溶剂以及稀释倍数不够所造成的样品基质干扰,造成 ELISA

的假阳性等问题。其次,采用间接竞争 ELISA 方法进行检测,该方法具有灵敏度高,降低基质干扰等优点,由于包被的是 DON-BSA 抗原,其分子量较大,可长期保存,加上采用干燥,抽真空等工艺,增加了板条的有效期。再次,抗体工作液及酶标记二抗工作液中,均加入了杂蛋白、糖类物质,以保证抗体分子的活性及构象的稳定性。

本试剂盒在 37℃ 下可放置 120 h,在 4℃ 上至少可保 7 个月。最低检测浓度为 20 ng/mL,检测范围为 50~400 ng/mL,IC₅₀ 103 ng/mL。平均加标回收率 >80%,批内变异系数 <10%,批间变异系数 <15%。用试剂盒测定盲样,其结果与德国拜发试剂盒及免疫亲和柱-高效液相色谱检测结果无显著性差异。试剂盒指标符合国家标准的相关技术要求,具有快速、灵敏、准确、方便等特点^[6]。

参 考 文 献

- 1 Zhang X H, Xie T X, Li S S, et al. Contamination of fungi and foodstuffs in high risk area of esophageal cancer [J]. Biomed Environ Sci, 1998, 11(2):140~146
- 2 Orrissey R E, Vesonder R F. Effect of deoxynivalenol (vornitoxin) on fertility, pregnancy, and postnatal development of Sprague Dawley rats [J]. Appl Envir Microbiol, 1985, 49: 1 062~1 066
- 3 王志萍,王德良,冯作山,等.运用免疫亲和柱和高效液相色谱(HPLC)检测啤酒大麦中的脱氧雪腐镰刀菌烯醇[J].食品与发酵工业,2008,34(9):137~139
- 4 邓舜洲,游淑珠,许杨.脱氧雪腐镰刀菌烯醇人工抗原的研制[J].食品科学,2007,28(2):149~152
- 5 Chris M M, Susan P M. Monoclonal antibodies for the mycotoxins deoxynivalenol and 3-acetyl-deoxynivalenol [J]. Food and Agricultural Immunology, 2000(12): 181~192
- 6 GBT5009.111-2003 谷物及其制品中脱氧雪腐镰刀菌烯醇的测定

Development of ELISA-kit of Quantitative Analysis for Deoxynivalenol

He Qinghua, Xu Yang, Liu Renrong, Deng Shunzhou

(The National Key Laboratory of Food Science and Technology, Nanchang 330029, China)

ABSTRACT To develop a rapid, sensitive, and quantitative ELISA-Kit for deoxynivalenol and the determination of deoxynivalenol in cereals. Methods: Based on monoclonal antibodies against DON, apply indirect-competitive ELISA to study the performance of the kit. Results: The limited concentration of detection of ELISA kit was 20 ng/ml. Linear range was 50-400 ng/ml. The inhibition concentration of 50% against of DON was 103 ng/ml. The average recovery rate of samples was above 80%, the with-run coefficient of variation was under 10%; the between-run coefficient of variation was under 15%. The result showed that there was no distinct difference between the HPLC from Germany Bio-pharm ELISA-kit and our ELISA-kit. Conclusion: This ELISA-kit was quick, sensitive, and stable and can be used to determine DON in cereals.

Key words Deoxynivalenol, ELISA, ELISA-Kit