

总黄曲霉毒素 ELISA 定量检测方法的研制

江涛 柳桢 郑佳 李敏 计融

(中国疾病预防控制中心营养与食品安全所,北京 100021)

摘要:为敏感、特异和快速地检测食品中总黄曲霉毒素的污染水平,在抗总黄曲霉毒素单克隆抗体的基础上,研制了间接竞争 ELISA 检测方法,包被抗原为 AFB₁-BSA,包被量为0.062 5 μg/ml,抗体工作浓度为 1:1.6 ×10⁶。该方法对黄曲霉毒素 B + G 标准品的最低检出浓度为0.13 ng/ml,对样品的最低检出量为1.50 μg/kg。校正曲线的线性范围为 0.26~20.00 ng/ml,线性方程 $y = -0.4463x + 0.3532$ ($R^2 = 0.9915$);对黄曲霉毒素 B + G 50%的抑制浓度为 2.08 ng/ml;对玉米 2 个加标水平的平均回收率分别为 94.56%和 112.05%,对花生 2 个加标水平的平均回收率分别为 87.50%和 85.60%。该方法所用抗总黄曲霉毒素单克隆抗体对黄曲霉毒素 B₁、B₂、G₁、G₂ 的交叉反应率分别为 100%、57.5%、104%和 19%,与其它真菌毒素无交叉反应。

关键词:黄曲霉毒素类;抗体,单克隆;酶联免疫吸附测定

一特征吸收峰,并且发生顺式异构的位置越靠近分子中部该特征吸收峰越高^[3]。根据已有文献[8,9]的报道以及图9所显示的各组分光谱特征,鉴定:组分为 13,13' 顺式番茄红素;组分为 11,11' 顺式番茄红素;组分为 9,9' 顺式番茄红素。

从图7和图9的比较可以看出,在相同洗脱条件下,C₃₀柱与 C₁₈柱比较,番茄红素顺式异构体在 C₃₀柱子上不再与全反式异构体存在于一个组分中,而得到了分离。达到这种分离效果的主要原因是 C₃₀固定相具有更长的烷基链,导致固定相的疏水性增加,从而使番茄红素的保留时间延长,进而提高了柱效,最终能够较好地将顺、反式异构体分离。

参考文献

- [1] Young A J, Britton G, eds. Carotenoids in photosynthesis [M]. London: Chapman and Hall, 1993. 409-416.
 [2] Britton G, Liaaen-Jensen S, Pfander H, eds. Carotenoids (1A) Basel [M]. Boston and Berlin: Birkhäuser, 1995. 169-284.
 [3] 惠伯棣,文镜,裴凌鹏,主编.类胡萝卜素化学及生物化学[M].北京:中国轻工出版社,2005. 117-129.

- [4] 惠伯棣,欧阳清波,曾悦.植物食品中类胡萝卜素的高压液相色谱检测[J].中国食品添加剂,2002,(5):72-82.
 [5] Riemersma R A, Wood D A, Macintyre C C, et al. Risk of angina pectoris and plasma concentrations of vitamins A, C, E and carotene[J]. Lancer, 1991,(337):1-5.
 [6] Tsukida K, Saiki K, Takii, et al. Separation and determination of cis/trans- carotenes by high-performance liquid chromatography[J]. J Chromatogr,1982,(245):359-364.
 [7] Lin C H, Chen B H. Determination of carotenoids in tomato juice by liquid chromatography [J]. J Chromatogr, 2003, (1012):103-109.
 [8] Emenhiser C, Sander L C. Separation of geometrical carotenoid isomers in biological extracts using a polymeric C₃₀ column in reversed-phase liquid chromatography [J]. J Agric Food Chem,1996,(44):3887-3893.
 [9] Emenhiser C, Sander L C, Schwartz S J. Capability of a polymeric C₃₀ stationary phase to resolve cis-trans carotenoid isomers in reversed phase liquid chromatography[J]. J Chromatogr A, 1995,(707):205-216.

[收稿日期:2006-03-22]

中图分类号:R15;O657.72 文献标识码:A 文章编号:1004-8456(2006)04-0289-04

基金项目:国家“十五”科技重大专项(2001BA804A20)

作者简介:江涛 男 副研究员

通讯作者:计融 男 研究员

Quantitative Analysis of Aflatoxins by ELISA

JIANG Tao, LIU Zhen, ZHENG Jia, LI Min, JI Rong

(National Institute for Nutrition and Food Safety, Chinese CDC, Beijing 100021, China)

Abstract: To detect the level of contamination of total aflatoxins in grains, a rapid, specific and quantitative ELISA-based method was developed using monoclonal antibodies against Aflatoxins. The coating antigen was AFB₁-BSA and the concentration was 0.0625 µg/ml. The working titre of antibody was 1: 1.6 × 10⁶. For the standard Aflatoxin (B + G), the limit of detection was 0.13 ng/ml; for samples, the limit of detection was 1.50 µg/kg; the linear range was 0.26 ~ 20.00 ng/ml and the linear equation was $y = -0.4463x + 0.3532$ ($R^2 = 0.9915$). The 50% inhibition concentration for Aflatoxin (B + G) was 2.08 ng/ml. The recovery rates of spiked maize on the level of 2.10 µg/kg and 10.40 µg/kg were 94.56% and 112.05% respectively. For peanut recovery rates on the level of 2.00 µg/kg and 4.00 µg/kg were 87.50% and 85.60%, respectively. The cross reaction rates with aflatoxin B₁, B₂, G₁, G₂ were 100%, 57.5%, 104%, 19% respectively, and there were no cross reactions with other mycotoxins.

Key word: Aflatoxins; Antibody Monoclonal; Enzyme-Linked Immunosorbent Assay

总黄曲霉毒素的检测方法主要有薄层层析法、色谱法。我国执行的食品中总黄曲霉毒素 B₁ + B₂ + G₁ + G₂ 的国家标准测定方法是薄层色谱法和微柱筛选法,均为目测半定量法,最低检出浓度为 5 µg/kg^[1]。这些方法,有的因方法本身的限制,精确度低、敏感性差;有的样品前处理过程复杂费时;有的需要价格昂贵的仪器,检测成本高,难以推广应用,影响了粮油食品中黄曲霉毒素的有效监测。酶联免疫吸附测定法(ELISA)是在免疫学和细胞工程学基础上发展的一种微量检测技术,特别适合于对黄曲霉毒素污染监控中大量样本的筛检。欧美一些国家早已开展这方面的研究,建立了检测食品中总黄曲霉毒素的 ELISA 检测方法。我国目前还没有建立检测食品中总黄曲霉毒素的 ELISA 方法。2002 年国家科技部设立了“十五”国家科技攻关课题“生物毒素和中毒控制中常见毒物快速测定技术的研究”,要求建立检测食品中总黄曲霉毒素的 ELISA 方法,满足国际上对总黄曲霉毒素限量标准日趋严格的趋势。

本研究利用 B 细胞杂交瘤技术培养了能分泌抗总黄曲霉毒素单克隆抗体的杂交瘤细胞株,检测玉米、花生中的总黄曲霉毒素。

1 材料与方法

1.1 主要仪器及试剂 CO₂ 培养箱(美国 Queue 公司)、洁净工作台(北京半导体设备一厂)、生物倒置显微镜(日本欧林巴斯光学株式会社)、酶标分析仪(SUNRISE)、电子分析天平(瑞士 Mettler 公司)、低温高速离心机(德国 Hermle 公司)、电泳仪(BIO-RAD)等。

AFB₁-BSA、黄曲霉毒素(B + G)(Aflatoxin B + G)、黄曲霉毒素 B₁(Aflatoxin B₁)、黄曲霉毒素 B₂

(Aflatoxin B₂)、黄曲霉毒素 G₁(Aflatoxin G₁)、黄曲霉毒素 G₂(Aflatoxin G₂)、T-2 毒素(T-2 toxin)、赭曲霉毒素 A(Ochratoxin A)、展青霉素(Patulin)、脱氧雪腐镰刀菌烯醇(Deoxynivalenol, DON)、玉米赤霉烯酮(Zearalenone, ZEN)、匙孔瓣血蓝素(Keyhole limpet hemocyanin, KLH)、牛血清白蛋白(Bovine serum albumin, BSA)、伏马菌素 B₁、抗体亚类测定试剂盒(IgM、IgG、IgA、IgD、IgG₁、IgG_{2a}、IgG_{2b}、IgG₃),均购自美国 Sigma 公司;RPMI1640 培养基、HAT 选择性培养基、HEPES、福氏佐剂(完全、不完全)、二甲基亚砜(DMF)、吐温 20(Tween 20)、聚乙二醇(PEG, MW 5000)、青霉素、链霉素,均购自 Gbco 公司;辣根过氧化物酶羊抗鼠 IgG 购自北京中山试剂公司,30% H₂O₂ 保证试剂购自北京化工厂。

溶液系统 ELISA 使用液 包被液 0.05 mol/L 碳酸盐缓冲液, pH 9.6; 洗涤液 PBS - T, 含 0.05% Tween20 的 0.05 mol/L PBS(体积分数); 底物缓冲液 0.1 mol/L 柠檬酸加 0.2 mol/L 磷酸氢二钠, pH 5.0; 底物溶液 10 mg TMB 加入 1 ml 二甲基甲酰胺, 冷冻保藏。用时取此溶液 75 µl, 加 10 ml 底物缓冲液和 10 µl H₂O₂; 终止液 2 mol/L H₂SO₄。抗体稀释液含 0.1%(重量体积分数)BSA 的 0.05 mol/L PBS。

细胞系与实验动物 小鼠骨髓瘤细胞系 Sp2/0 由本室传代,并经 8-氮杂鸟嘌呤处理。

BalB/c 小鼠 购自军事医学科学院实验动物研究所动物繁育场。

抗总黄曲霉毒素杂交瘤细胞株 本研究室自制。

1.2 方法

1.2.1 单克隆抗体的生产 将抗总黄曲霉毒素杂交瘤细胞注入 BalB/c 小鼠腹腔,获得含抗总黄曲霉毒素单克隆抗体的腹水,并将所得腹水采用饱和硫

酸铵盐析法进行纯化^[2]。

1.2.2 抗体特性鉴定 抗体的免疫球蛋白类别及亚类鉴定采用抗体亚类鉴定试剂盒;抗体的纯度及分子量用 SDS - PAGE 测定^[3];IgG 含量采用 BCA 蛋白测定试剂盒进行测定;抗体滴度测定采用间接非竞争 ELISA 方法^[2]:以 AFB₁ - BSA 为包被抗原,从 1 10 000 倍开始将抗体进行倍比稀释,以 Sp2/0 细胞培养上清液为阴性对照,以(测定孔 A 值 - 空白值)/(阴性对照 A 值 - 空白值) 2.1 的最大稀释倍数为滴定终点;抗体的特异性和抗体的灵敏度用间接竞争抑制性 ELISA 法进行测定^[4],参试毒素为黄曲霉毒素 B₁、B₂、G₁、G₂、脱氧雪腐镰刀菌烯醇(DON)、赭曲霉毒素 A(OA)、伏马菌素 B₁、T-2 毒素和载体蛋白 BSA。

1.3 间接竞争 ELISA 检测方法的建立^[5]

1.3.1 方法的检出限(灵敏度) 用间接非竞争 ELISA 法作抗体滴度测定,找出抗体工作浓度为 1.6×10^6 。再用间接竞争 ELISA 法作棋盘滴定,用 AFB₁ - BSA 作包被抗原,找出适宜的包被抗原浓度为 0.0625 μg/ml,每孔包被量为 120 μl。最后作校正曲线,黄曲霉毒素(B + G)标准品的竞争浓度分别为 0、0.026、0.052、0.13、0.26、0.52、1.30、2.60、5.20、13.00、26.00、52.00、130.00、260.00 ng/ml,与选定的抗体的工作浓度(1.6×10^6)等体积混合,每个浓度做 3 个平行孔,连续重复 3 次,所得曲线稳定。校正曲线见图 1。根据标准校正曲线,该方法对黄曲霉毒素 B + G 标准品的灵敏度为 0.13 ng/ml。

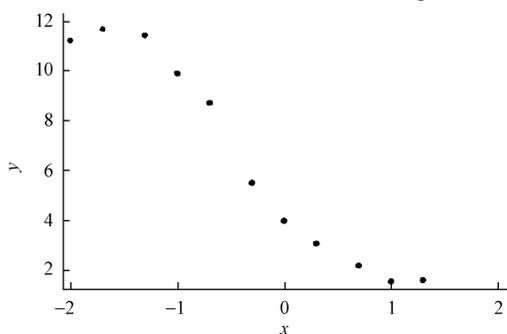


图 1 黄曲霉毒素(B + G)标准校正曲线(ELISA)

1.3.2 方法的回收率试验 根据标准校正曲线的线性范围确定加标浓度,在不含黄曲霉毒素的玉米和花生试样中分别进行 2 个浓度的加标回收试验,玉米的加标浓度为 2.10、10.40 μg/kg,花生的加标浓度为 2.00、4.00 μg/kg。每个加标水平做 5 个重复的平行样。

试样的提取方法 试样粉碎后使其 90% 通过 250 ~ 500 μm 网筛。称取 5 g 加到 100 ml 具塞三角烧瓶中,加入 0.5 g NaCl 及 25 ml 甲醇水溶液(70 +

30,体积分数),剧烈震荡 30 min 后过滤。滤液用纯水稀释 10 倍进行检测。

$$\text{试样中黄曲霉毒素浓度}(\mu\text{g}/\text{kg}) = CDX/W$$

式中: C—酶标板上测的黄曲霉毒素浓度 (ng/ml),根据校正曲线求得; D—试样提取液的体积 (ml); X—稀释倍数; W—试样质量 (g)。

1.3.2 方法的专一性(特异性) 用交叉反应率表示(见抗体特性鉴定)。

1.3.3 ELISA 方法与 HPLC 方法之间的验证 分别采用本研究建立的 ELISA 方法和 AOAC 提出的 HPLC 方法对玉米、花生盲样同时进行测定,统计两种方法对样品的检测结果差异有无显著性。

2 结果

2.1 单克隆抗体特性鉴定 杂交瘤细胞株产生的腹水抗体经纯化后,抗体滴度约为 $1:2.56 \times 10^7$,抗体的工作浓度为 1.6×10^6 。抗体对黄曲霉毒素 B₁、B₂、G₁、G₂ 毒素标准品 50% 的抑制浓度分别为 1.20、2.09、1.15 和 6.31 ng/ml(见图 2、3、4、5)。该抗体的亚类为 IgG₁,抗体的亲和力常数为 1.52×10^{10} mol/L。抗体的相对分子量约为 150 kD,纯化后 IgG 浓度为 10 g/L。抗体与黄曲霉毒素 B₁、B₂、G₁、G₂ 的交叉反应分别为 100%、57.5%、104% 和 19%,与 T-2 毒素、赭曲霉毒素 A、展青霉素、脱氧雪腐镰刀菌烯醇、玉米赤霉烯酮、伏马菌素 B₁ 等其它真菌毒素和牛血清白蛋白的交叉反应均小于 0.1%。

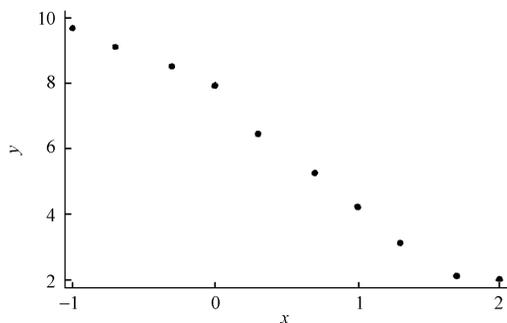


图 2 黄曲霉毒素 B₁ 校正抑制曲线(ELISA)

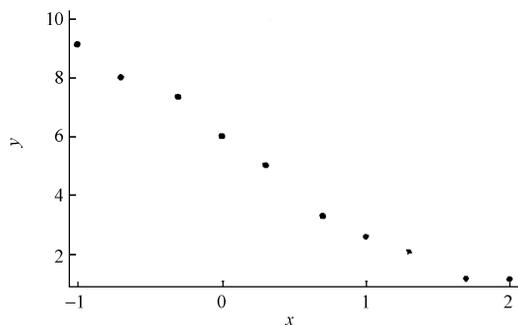


图 3 黄曲霉毒素 B₂ 校正抑制曲线(ELISA)

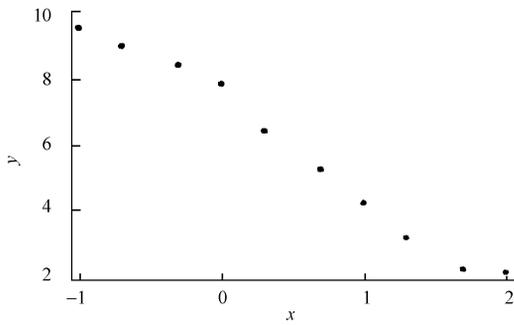


图4 黄曲霉毒素 G₁ 校正抑制曲线 (ELISA)

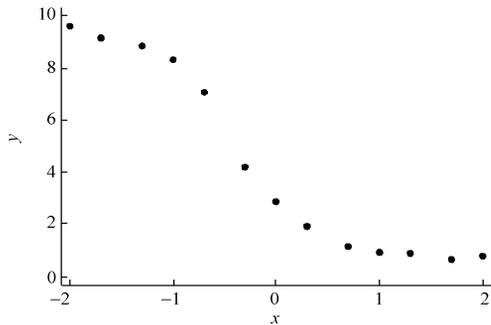


图5 黄曲霉毒素 G₂ 校正抑制曲线 (ELISA)

2.2 ELISA 方法技术参数

2.2.1 经过棋盘滴定,抗体的最适工作浓度为 $1:1.6 \times 10^6$, AFB₁ - BSA 的最适包被浓度为 0.062 5 μg/ml。

2.2.2 回收率测定 对玉米做黄曲霉毒素 (B + G) 作 2.10 和 10.40 μg/kg 2 个加标浓度的回收率试验, 结果见表 1。对花生做黄曲霉毒素 (B + G) 2.00 和 4.00 μg/kg 2 个加标浓度的回收率试验, 结果见表 2。

表 1 玉米中黄曲霉毒素 (B + G) 回收率试验结果 %

样品编号	回收率 1	回收率 2
1	96.77	117.24
2	98.13	103.86
3	94.56	116.36
4	86.58	113.38
5	96.77	109.40
平均回收率	94.56	112.05
RSD	4.91	4.92

注: 回收率 1: 加标准品后试样浓度 2.10 μg/kg; 回收率 2: 加标准品后试样浓度 10.40 μg/kg。

表 2 花生中黄曲霉毒素 (B + G) 回收率试验结果 %

样品编号	回收率 1	回收率 2
1	80.37	97.96
2	75.67	96.61
3	90.03	76.92
4	103.86	75.76
5	87.58	80.77
平均回收率	87.50	85.60
RSD	10.78	10.83

注: 回收率 1: 加标准品后试样浓度 2.00 μg/kg; 回收率 2: 加标准品后试样浓度 4.00 μg/kg。

2.2.3 方法的专一性 将其它参试毒素及载体蛋白 BSA 分别以 0、0.10、0.20、0.50、1.00、2.00、5.00、10.00、20.00、50.00、100.00、200.00、500.00、1000.00、2000.00 ng/ml, 与抗体等体积混合进行交叉反应, 未出现 50% 的抑制浓度, 亦即相对于黄曲霉毒素而言, 其它参试毒素及载体蛋白 BSA 与抗总黄曲霉毒素单克隆抗体的交叉反应率小于 1%, 故可认为抗总黄曲霉毒素单克隆抗体特异性很好。

2.2.4 ELISA 方法与 HPLC 方法之间的验证 分别采用本研究建立的 ELISA 方法和 AOAC 提出的 HPLC 方法对玉米、花生盲样同时进行测定, 结果见表 3。将两种方法的检测结果进行 *t* 检验, 结果 $P > 0.05$, 两种方法对样品的检测结果差异无显著性。

表 3 ELISA 方法与 HPLC 对

序号	样品检测结果的比较					μg/g
	1	2	3	4	5	6
ELISA	6.27	6.55	6.41	16.14	16.48	16.18
HPLC	8.60	7.20	7.12	14.71	15.20	15.20

2.2.5 建立的 ELISA 方法与 Biopharm 公司商品化试剂盒各指标之间的比较 见表 4。

表 4 ELISA 方法与 Biopharm 公司商品化试剂盒各指标间的比较

比较指标	ELISA	ELISA Kit of Biopharm
检测限 μg/kg	1.50	1.75
平均回收率 %	94.9	85
变异系数 %	7.9	15
适用范围	玉米、花生	谷物、饲料
特异性		
AFB ₁	100.0	100
AFB ₂	57.5	200
AFG ₁	104	15
AFG ₂	19	16

从表 4 可以看出, 所建立的 ELISA 方法, 样品的检测限、平均回收率、相对标准差等方面与 Biopharm 公司商品化试剂盒差异没有显著性, 在适用范围方面, 所建立的 ELISA 方法主要针对玉米、花生, 针对性强; 而 Biopharm 公司商品化试剂盒适用于谷物和饲料, 适用范围广, 两者各有侧重。

在制备出针对黄曲霉毒素 B₁、B₂、G₁、G₂ 均有较好的交叉反应并且有较好的灵敏度和特异性的单克隆抗体基础上, 研制了检测食品中黄曲霉毒素 ELISA 方法。

该方法的最低检出浓度为 0.26 μg/kg, 样品的最低检出量为 1.50 μg/kg。所用单克隆抗体与其它参试真菌毒素均无交叉反应, 因此该方法具有较高的特异性。玉米 2 个加标水平的平均回收率为 94.56% 和 112.05%, 花生 2 个加标水平的平均回收率为 87.50% 和 85.60%。该方法具有操作简便、快

Cry1Ie 基因大肠杆菌表达蛋白对小鼠血液生化和肠道菌群的影响

张小霞¹ 杨宝兰¹ 严卫星¹ 刘允军² 王国英² 徐海滨¹

(1. 中国疾病预防控制中心营养与食品安全所, 北京 100021; 2. 中国农业大学生物学院, 北京 100094)

摘要:为检测大肠杆菌表达的 Cry1Ie 蛋白为模式蛋白对小鼠血液生化和肠道菌群的影响, 提供 Cry1Ie 基因的食用安全依据。将 72 只 ICR 小鼠分为 Cry1Ie 基因表达蛋白组(以 833 μg/kg BW d⁻¹ 剂量喂饲小鼠 30 d)、小牛血清白蛋白对照组和空载体大肠杆菌菌液对照组, 观察小鼠体重、测定血液生化指标(谷丙转氨酶、谷草转氨酶、总蛋白、血清白蛋白、尿素氮、肌苷、甘油三酯、胆固醇、血糖)和肠道菌群数量(肠杆菌、肠球菌、双歧杆菌、乳酸杆菌)。Cry1Ie 基因表达蛋白组与大肠杆菌菌液对照组、小牛血清白蛋白对照组比较, 小鼠体重、血液生化指标和肠道菌群各指标的影响均未发现差异有显著性。实验结果显示在本实验条件下, Cry1Ie 基因表达蛋白未对动物健康产生影响。

关键词:蛋白质类; 大肠杆菌; 血液化学分析; 小鼠

Effects of Cry1Ie Protein Expressed in *E. coli.* on Biochemical Indicators and Flora of Intestinal Tract in Mice

ZHANG Xiao-xia, YANG Bao-lan, YAN Wei-xing, LIU Yun-jun, WANG Guo-ying, XU Hai-bin

(National Institute for Nutrition and Food Safety, Chinese CDC, Beijing 100021, China)

Abstract: Cry1Ie expressed protein is used as a model protein to examine its effects on biochemical indicators and flora of intestinal tract in mice. 72 ICR mice were randomly divided into one experimental group and two control groups. The experimental group was treated with 833 μg/kg BW d⁻¹ Cry1Ie expressed protein. The two control groups were treated with solution of bovine serum albumin and culture solution of *E. coli.* with control plasmid without Cry1Ie, respectively. After 30 days, body weight, biochemical indicators (AST, ALT, TP, ALB, BUN, CRE, TRIG, CHOL, GLU) and numbers of flora of intestinal tract (enteric bacilli, enterococci, *Bacillus bifidus*, lactobacilli) were examined. There were no significant differences between experimental group and control groups in body weight, biochemical indicators and numbers of flora of intestinal tract. In the present study, the Cry1Ie expressed protein had no toxicity to experimental animals. These results offer basic information for safety evaluation of new transgenic Cry1Ie expressed food, and establish foundation for food safety assessment of exogenous proteins derived from modern biological technique.

Key word: Proteins; *Escherichia coli*; Blood Chemical Analysis; mice

速, 可同时检测大量样品。该方法拟申报国家标准检测方法。

本研究成功地制备出针对黄曲霉毒素(B + G)具有高亲和力、高特异性的单克隆抗体, 建立了检测食品中总黄曲霉毒素的间接竞争 ELISA 检测方法, 为开展全国性总黄曲霉毒素污染调查提供了技术支持。

参考文献

[1] GB/T 5009.23—2003. 食品中黄曲霉毒素 B₁、B₂、G₁、G₂ 的测定[S].

- [2] 董志伟, 王炎. 抗体工程[M]. 第2版. 北京: 北京医科大学出版社, 2002. 280-282.
- [3] 金冬雁, 黎孟枫, 主译. J 萨姆布鲁克, E F 弗里奇, T 曼尼阿蒂斯, 著. 分子克隆实验指南[M]. 第2版. 北京: 科学出版社, 1996. 880-887.
- [4] 江涛, 王环宇, 高秀芬, 等. 赭曲霉毒素 A 单克隆杂交瘤细胞系的建立及特性[J]. 中国食品卫生杂志, 2004, 16(1): 14-17.
- [5] 江涛, 李凤琴, 王环宇, 等. 赭曲霉毒素 A 免疫学检测方法的研究[J]. 中国公共卫生, 2004, 20(5): 556-559.

[收稿日期: 2006-03-22]

中图分类号: R15; R379; Q949.32 文献标识码: A 文章编号: 1004-8456(2006)04-0292-05

基金项目: 国家科技部转基因专项(J00-C-003)

作者简介: 张小霞 女 硕士

通讯作者: 徐海滨 男 研究员 博士生导师