

酶联免疫吸附法测定小麦中脱氧雪腐镰刀菌烯醇

肖娟¹, 辛苑¹, 冯莎¹, 栾先国¹, 李凤琴², 赵丽^{1*}

(1. 山东大学公共卫生学院, 济南 250012;

2. 中国疾病预防控制中心营养与食品安全所, 北京 100052)

摘要: 目的 建立小麦中脱氧雪腐镰刀菌烯醇(deoxynivalenol, DON)含量测定的酶联免疫吸附(ELISA)分析方法。方法 选取山东省4地区小麦样品80份, 用不同溶剂对小麦中的DON进行提取后, 构建小麦中DON的ELISA检测方法, 根据国家标准对检测结果进行评价。结果 选用84%的乙腈水溶液作为提取溶剂, 其平均回收率可达100.2%, 较为理想。该ELISA方法检测小麦中DON, 线性范围是5~5000 ng/g, 回归方程 $Y=0.0419X+0.0222$, 相关系数 $r=0.9868$, 样品中DON含量为5.27~3639.38 ng/g, 中位数为79.25 ng/g, 在所检测的80份样品中, 有4份超出了国家规定的上限标准(1000 ng/g), 76份符合国家规定, 合格率为95%。结论 该方法灵敏、快捷, 适用于小麦中脱氧雪腐镰刀菌烯醇的检测。

关键词: 脱氧雪腐镰刀菌烯醇; 小麦; 酶联免疫吸附法

Determination of deoxynivalenol in wheat by enzyme-linked immunosorbent assay

XIAO Juan¹, XIN Yuan¹, FENG Sha¹, LUAN Xian-Guo¹, LI Feng-Qin², ZHAO Li^{1*}

(1. School of Public Health, Shandong University, Jinan 250012, China;

2. Institute of Nutrition and Food Hygiene, Chinese Center for Disease Control and Prevention, Beijing 100052, China)

ABSTRACT: Objective To explore a method of enzyme-linked immunosorbent assay (ELISA) for determination of deoxynivalenol(DON)in wheat. **Methods** A total of 80 wheat samples collected from 4 regions of Shandong province were extracted by different solvents, detected by ELISA and evaluated according to national standard. **Results** Optimal DON extraction was obtained when 84% acetonitrile was used in the extraction agent which could guarantee the mean extraction rate of 100.2%. The method showed a good linearity over the range of 5~5000 ng/g for deoxynivalenol and the regression equation was $Y=0.0419X+0.0222$ with $r=0.9868$. The content of deoxynivalenol in wheat was 5.27~3639.38 ng/g with median of 79.25 ng/g. The concentration of 4 samples among the totals was higher than the DON tolerance limitation of 1000 ng/g, and the qualified rate was 95%. **Conclusion** The method is accurate and efficient and it is suitable for the determination of DON in wheat.

KEY WORDS: deoxynivalenol; wheat; enzyme-linked immunosorbent assay

脱氧雪腐镰刀菌烯醇(deoxynivalenol, DON)是B类单端孢霉烯族化合物中的一种, 主要由禾谷镰刀菌

和粉红镰刀菌的某些菌株产生, 在许多谷物如小麦、大麦和玉米中普遍存在。其化学性能稳定, 具有较强

*通讯作者: 赵丽, 副教授, 博士, 主要研究方向为微生物检验。E-mail: dlzhl@sdu.edu.cn

*Corresponding author: ZHAO Li, Associate Professor, School of Public Health, Shandong University, No.44, Wenhuxi Road, Jinan 250012, China. E-mail: jingdaping@gmail.com

的热抵抗力和耐酸性, 易溶于中等极性的有机溶剂, 在实验室中长期储存浓度不变^[1]。DON 对粮谷类的污染状况与产毒菌株、温度、湿度、通风和日照等因素有关, 其污染不仅使农作物品质降低, 牲畜和人进食 DON 污染的粮谷后会发生急慢性中毒。一次性大量摄入 DON 可引起厌食、呕吐、腹泻、发烧、站立不稳、反应迟钝或死亡等急性中毒症状, 而长期小剂量接触 DON 还可能造成免疫抑制、诱发多种正常细胞的凋亡, 甚至导致肿瘤的发生^[2]。因此将粮食中 DON 含量测定作为常规食品微量物质检测项目之一是非常必要的, 而选择一种简便、低廉的检测方法对于开展粮食中 DON 的常规检测至关重要, 本研究采用传统的 ELISA 方法, 优化检测步骤, 测定小麦中 DON 含量。

1 材料与方法

1.1 试剂与仪器

牛血清白蛋白, 购自盐城赛宝生物科技有限公司; DON 毒素购自北京泰乐祺科技有限公司; 抗 DON 单克隆抗体(McAb)由本实验室制备^[3]; 辣根过氧化物酶标记的羊抗鼠 IgG, 购自北京中衫试剂公司; DON-牛血清白蛋白(bovine serum albumin, BSA)(Bbquire 公司); BALB/c 小鼠(动物批准号: SCXK-军 2007-004)购于中国军事医学科学院实验动物研究所。

1.2 样品的采集

按照地域划分, 在山东省聊城、临沂、烟台、潍坊 4 个地区, 每个地区采集 20 份样品, 每份 500 g, 干燥密封保存。

1.3 抗 DON 单克隆抗体制备

采用文献[4]小剂量长周期的免疫方案, DON-牛血清白蛋白(bovine serum albumin, BSA)和偶联物免疫雌性 BALB/c 小鼠, 获得分泌抗 DON 的 McAb 的杂交瘤细胞株。ELISA 检测上清液抗体阳性率。采用小鼠体内腹水诱生法制备单克隆抗体, 饱和硫酸铵进行纯化。

1.4 竞争 ELISA 检测 DON 条件的建立

DON 标准工作液的配制: 用甲醇-PBS(7 3,v/v)将 DON 标准品溶解成为 1.00 mg/mL 的标准储备溶

液, -20 °C 保存。

用 PBS 将 DON 标准储备液倍比稀释至 10.00、5.00、2.50、1.25 $\mu\text{g/g}$ 、625.00、312.50、156.25、78.13、39.06、19.53、9.77、4.88 ng/g 12 个浓度。

用上述梯度稀释的 DON 标准工作液分别与 1:40 的 McAb 溶液进行 1 1 混合, 置 4 °C 竞争过夜, 同时用 PBS 作为空白对照。

以 DON-BSA 包被酶标板, 分别加入 McAb 与 DON 毒素混合液及阴性对照, 每孔 100 μL , 进行 37 °C 孵育 2 h。用 PBS-T(PBS 中加入吐温)洗液洗涤酶标板 3 次, 每次 1 min。

将 HRP-标记的羊抗小鼠 IgG 1 5000 用 0.5% 的 BSA 进行稀释后, 以每孔 100 μL 加入酶标板中, 孵育 1 h。

加入底物缓冲溶液进行显色, 10 min 后终止反应, 于 405 nm 波长在分光光度计上测定吸光度值。以 $-\log_2[\text{DON}]$ 为横坐标, 相应的吸光度值(A 值)为纵坐标, 绘制竞争抑制标准曲线, 并计算出回归方程及相关系数 r 值。

1.5 DON 提取方法优化

1.5.1 小麦中 DON 提取溶剂的优化

将不含 DON 的小麦粉碎后, 取粉碎后的样品, 按照 1 $\mu\text{g/g}$ 的浓度添加 DON 标准溶液, 静置挥干溶剂后, 分别以含有 5%氯化钠和不含氯化钠的不同浓度甲醇-水溶液(甲醇浓度分别为 55%、65%)以及乙腈-水溶液(84%)提取样品中的 DON, 每个浓度做 3 个平行, 分别计算 DON 的回收率。

1.5.2 提取过程的优化

为模拟自然状态下 DON 在小麦中的分布以及排除提取液对检测结果的影响, 实验采用以下步骤:

(a) 按照 1 g 小麦粉加 20 mL 提取溶剂的比例进行提取;

(b) 选用 100 W 功率超声振荡 3 min 后过滤;

(c) 取 4 mL 提取液于氮气气流下吹干;

(d) 用 500 μL 20%的甲醇溶液重新溶解;

(e) 进行 ELISA 检测。

1.5.3 提取方法确证实验

为评价提取方法的重复性, 每个样品设 3 个平行(加标量分别为 750, 1000, 1250 ng/g), 进行提取方法确证实验。以优化的方法提取并检测 DON, 每种样品每个加标浓度, 重复 3 次实验, 计算回收率、变异

系数(CV%)。

1.5.4 小麦中 DON 检测

1.5.5 工作曲线的建立

样品中 DON 的检测采用标准加入法。选取未检出 DON 的小麦样品, 分别加入不同浓度的 DON 标准液, 使样品中 DON 的含量为 5000.00, 2500.00, 1250.00, 625.00, 312.50, 156.25, 78.13, 39.06, 19.53, 9.77, 4.88 ng/g, 按上述优化的方法提取后, 用竞争 ELISA 检测提取液中 DON 的含量, 以 $-\log_2[\text{DON}]$ 为横坐标, 相应的吸光度(A)为纵坐标, 绘制工作曲线。

1.5.6 山东省4地区小麦样品检测

采用优化出的提取过程, 用所建立的 ELISA 方法对样品进行检测。依照《食品安全国家标准食品中真菌毒素限量》(GB2761-2011)对样品中 DON 的污染情况进行评价。所有数据用 SPSS 软件包进行统计学处理。

2 结果与分析

2.1 竞争 ELISA 标准曲线的建立

竞争 ELISA 所得竞争抑制曲线见图 1, 标准曲线的线性范围为 5~5000 ng/mL, 回归方程为 $Y=0.0419X+0.0222$, 相关系数 $r=0.9868$ 。

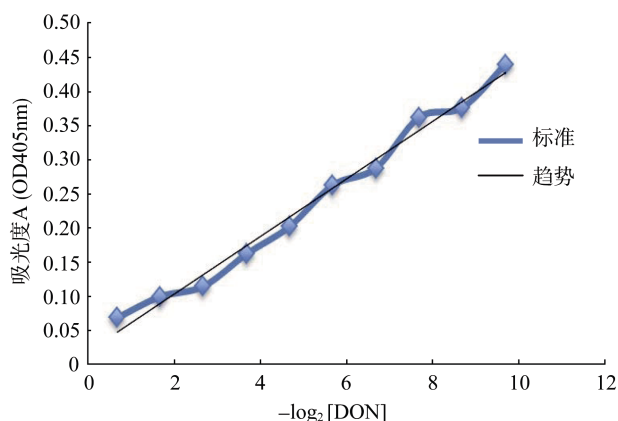


图1 ELISA 竞争抑制曲线

Fig.1 Competitive inhibitory standard curve of DON

2.2 提取方法的优化

不同提取液 DON 回收率结果见表 1, 由表 1 可以看出, 选用 84% 的乙腈水溶液作为粮食的提取液, 其提取率高, 稳定性好, 变异系数 $<10\%$ 。

经过优化, 选用 84% 的乙腈水溶液对小麦中三个不同浓度的 DON(加标量分别为 750、1000、1250

ng/g)进行提取, 结果见表 2 所示, 变异系数(%)为 8.00~8.89, 平均回收率为 98.43%~101.33%。

2.3 山东省4地区小麦 DON 含量检测结果

2.3.1 工作曲线的建立

以 84% 的乙腈水溶液提取 DON, 小麦中 DON 的竞争抑制 ELISA 工作曲线见图 2, 回归方程为 $Y=0.0294X+0.0481$, 相关系数 $r=0.9874$, 检出限 2 ng/g, 小麦最低检出浓度 5 ng/g。

2.3.2 山东省4地区小麦 DON 含量的检测结果

山东省 4 地区小麦 DON 最高检出量为 3639.38 ng/g, 最低检出量为 5.27 ng/g。如表 3, 4 地区小麦 DON 检出量中位数为 79.25 ng/g, 其中 4 个检测样本超出了国家限定(1000 ng/g 的规定上限), 其余的 76 个样本均符合国家标准, 为安全可食用小麦, 合格率为 95.00%。

3 讨论

DON 在粮食中的污染状况非常普遍, 尤其是在我国北方的小麦主产区如河北、河南、山东等地, 据相关调查统计小麦 DON 含量可达 170.22 mg/kg^[5]。DON 的检测方法有多种, 主要包括薄层色谱法、酶联免疫吸附、气相色谱、液相色谱、荧光极性免疫分析法等^[6]。与其他几种常用的方法相比, ELISA 酶联免疫方法灵敏度高, 特异性强, 可以一次性大规模、快速、准确检测各种粮食中的 DON 含量, 操作简单, 对仪器设备的要求低, 但在检测过程中检测结果不稳定, 易出现假阳性。本研究采用了本实验室自制单克隆抗体^[3], 建立了 DON 的 ELISA 检测方法, 检测线性关系良好, 最低检出限可达 2 $\mu\text{g/kg}$, 其检测灵敏度可以达到国家标准所规定 1000 $\mu\text{g/kg}$ (1000 ng/g)。

在 DON 的提取过程中, 多数学者采用不同配比的有机溶剂(如 60%~90% 的甲醇溶液, 84% 的乙腈溶液等)作为提取液, 提取率较高, 但有机溶剂对操作人员的毒副作用^[7]和其对 ELISA 反应结果的干扰, 让其应用受限; 也有研究选用超临界流体提取法, 虽然该法较为环保, 但是提取率偏低, 大批量检验仍有难度^[8]。本次研究仍采用有机溶剂提取法, 但在提取过程中进行了一系列的物理性改进, 摒弃传统的手摇振荡方法, 采用短时超声振荡, 使加标毒素分布更均匀; 稀释有机提取液(较传统有机提取液稀释 4~5 倍), 并采用氮气流进行蒸发浓缩, 缩短提取了时间。

表 1 溶剂提取效果
Table 1 Effect of extraction solvent

提取溶剂	DON 含量($\bar{X} \pm SD$)	平均回收率(%)	CV(%)
55%甲醇	558.7±128.50	55.87	23.0
65%甲醇	673.7±121.29	67.37	18.0
65%甲醇+5%NaCl	870.3±87.03	87.03	10.0
84%乙腈	1008.0±80.06	100.08	8.0
水	342.5±95.53	34.25	28.0

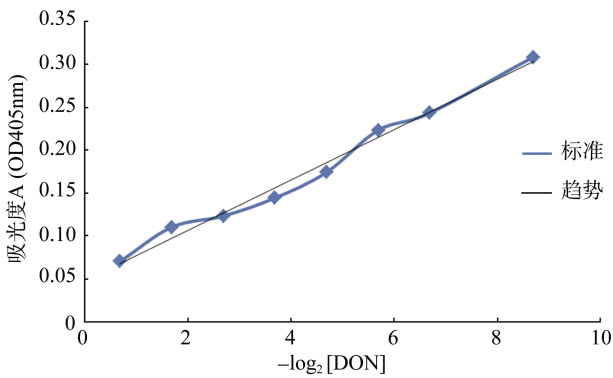


图 2 小麦中 DON 检测的工作曲线
Fig. 2 Work curve for DON in wheat

表 2 小麦 DON 回收率和变异系数
Table 2 Extraction rate and CV for DON in wheat

样品	DON 加标量 (ng/g)	DON 含量(ng/g) ($\bar{X} \pm SD$)	平均回收率 (%)	CV(%)
小麦	750	738.2 ± 63.78	98.43	8.64
	1000	1008.0 ± 80.06	100.8	8.00
	1250	1266.58 ± 112.60	101.33	8.89

表 3 小麦中 DON 含量的检测结果
Table 3 Contamination of DON in wheat

地区	样品数(份)	超标数(份)	中位数(ng/g)	合格率(%)
临沂	20	3	423.55	85
潍坊	20	1	301.43	95
烟台	20	0	5.99	100
聊城	20	0	21.59	100
总计	80	4	79.25	95

注: 检测数据不符合正态分布, 因此采用中位数代表样本集中趋势

本研究采用了标准加入法, 进一步降低了样品提取液中干扰物的影响, 使得检测结果更为理想。

经本研究优化的酶联免疫吸附技术检测小麦中

DON 含量, 方法简便, 检测灵敏, 根据国家针对 DON 在小麦中的限量标准^[9], 本次所检测的样品合格率达到 95%, 基本符合卫生学标准。

参考文献

[1] Wolf CE, Bullerman L B. Heat and pH alter the concentration of deoxynivalenol in an aqueous environment [J]. Food Prot, 1998, 6(1): 365–367.

[2] 庞炜, 王治伦, 吕社民. 真菌毒素 DON 研究进展[J]. 中国地方病杂志, 1996, 11(6): 349–351.

Pang W, Wang ZL, Lv DM. Deoxynivalenol, DON research [J]. Chin J Contr Endem Dis, 1996, 11(6): 349–351.

[3] 赵丽, 温红玲, 侯霄煜, 等. 抗脱氧雪腐镰刀菌烯醇单克隆抗体的制备及鉴定[J]. 山东大学学报(医学版), 2010, 48(12): 125–128.

Zhao L, Wen HL, Hou XY, *et al.* Preparation and characterization of monoclonal antibodies against deoxynivalenol [J]. J Shandong Univ (Health Sci), 2010, 48(12): 125–128.

[4] 李华, 祭芳, 徐剑宏, 等. 赤霉毒素脱氧雪腐镰刀菌烯醇 (DON)酶联免疫检测方法研究[J]. 中国农业科学, 2007, 40(4): 721–726.

Li H, Ji F, Xu JH, *et al.* Enzyme-linked immunosorbent-assay for deoxynivalenol(DON) [J]. Sci Agr Sin, 2007, 40(4): 721–726.

[5] 游淑珠, 许杨. 脱氧雪腐镰刀菌烯醇分析方法的现状[J]. 卫生研究, 2005, 34(1): 122–124.

You SZ, Xu Y. The situation of deoxynivalenol analytic methods [J]. J Hyg Res, 2005, 34(1): 122–124.

[6] 魏润蕴, 王竹天. 谷物中脱氧雪腐镰刀菌烯醇和雪腐镰刀菌烯醇的气相色谱测定[J]. 卫生研究, 1996, 25(4): 242–245.

Wei RY, Wang ZT. Gas chromatography testing of deoxynivalenol and oxynivalenol in grains [J]. J Hyg Res, 1996, 25(4): 242–245.

[7] Mateo JJ, Llorens A, Mateo R, *et al.* Critical study of and improvements in chromatographic methods for the analysis of type

B trichothecenes [J]. J Chromatogr A, 2001, 91(8): 99–112.

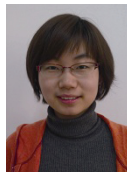
- [8] Josephs RD, Krska R, Grasserauer M, Brecken. Determination of trichothecene mycotoxins in wheat by use of supercritical fluid extraction and high-performance liquid chromatography with diode array detection or gas chromatography with electron capture detection [J]. J Chromatogr A, 1998, 795: 297–304.

- [9] GB2715-2005 粮食卫生标准[S].

GB2715-2005 Hygienic standard for grains [S].

(责任编辑: 张宏梁)

作者简介



肖娟, 本科在读, 主要研究方向为预防医学。

E-mail: xiaojuan8972@163.com



赵丽, 副教授, 博士, 主要研究方向为微生物检验。

E-mail: dlzhl@sdu.edu.cn