

# 脱氧雪腐镰刀菌烯醇(DON)直接竞争ELISA方法的建立

张银志<sup>1</sup>, 金萍<sup>1,2</sup>, 孙秀兰<sup>\*1,2</sup>, 徐丹<sup>2</sup>, 邵景东<sup>3</sup>

(1. 食品科学与技术国家重点实验室, 江南大学, 江苏 无锡 214122; 2. 江南大学 食品学院, 江苏 无锡 214122; 3. 张家港出入境检验检疫局, 江苏 张家港 215500)

**摘要:** 利用前期制备得到的 DON 酶标抗原(辣根过氧化物酶标记)以及抗 DON 抗体,建立检测食品中 DON 含量的直接竞争 ELISA 方法。该方法的检测范围 1~100 ng/mL,灵敏度达 0.56 ng/mL,半数抑制浓度 IC<sub>50</sub> 为 10 ng/mL;与 DON 类似物 T-2 毒素的交叉反应率为 12%;玉米淀粉样品回收率在 80.2%~91.1% 之间,平均批间变异<15%,平均批内变异<3%。

**关键词:** 脱氧雪腐镰刀菌烯醇(DON);酶标抗原;抗体;直接竞争 ELISA;辣根过氧化物酶(HRP)  
中图分类号: R 595.7 文献标识码: A 文章编号: 1673-1689(2012)01-028-05

## Establishment of the Direct Competition ELISA Method for Deoxynivalenol (DON)

ZHANG Yin-zhi<sup>1</sup>, JIN Ping<sup>1,2</sup>, SUN Xiu-lan<sup>\*1,2</sup>, XU Dan<sup>2</sup>, SHAO Jing-dong<sup>3</sup>

(1. State Key Laboratory of Food Science and Technology, Jiangnan University, Wuxi 214122, China; 2. School of Food Science & Technology, Jiangnan University, Wuxi 214122, China; 3. Zhangjiagang Entry-Exit Inspection and Quarantine, Zhangjiagang 215500, China)

**Abstract:** In this manuscript, the direct competition ELISA method for deoxynivalenol (DON) was established by using enzyme-labeled antigen of DON and antibody. It was found that the detection range of this method is 1 ~ 100 ng/mL, sensitivity 0.56 ng/mL, 50 % inhibitory concentration (IC<sub>50</sub>) 10 ng/mL, the cross-reaction rate to DON analogues T-2 toxin 12%, the recoveries of corn starch samples 80.2%~91.1%. Moreover, the average intra-assay variation and the average inter-assay variation is less than 15%, and 3%, respectively.

**Key words:** deoxynivalenol (DON), enzyme-labeled antigen, monoclonal antibody, direct competition ELISA method, horseradish peroxidase

脱氧雪腐镰刀菌烯醇(DON)是单端孢霉烯族毒素之一,广泛存在于谷物和饲料中,严重危害人类和动物的健康,DON可引起雏鸭、猪、猫、狗、鸽子等动物的呕吐反应,其中猪对DON最为敏

感<sup>[1]</sup>;Bosch<sup>[2]</sup>等对DON进行了小鼠体内实验,研究表明DON可以引起实验小鼠胃肠道出血、血尿甚至死亡。DON对热稳定,一般的烹调及加工不能破坏其毒性,Scott<sup>[3]</sup>发现谷物经加工后制成宠物

收稿日期: 2011-01-23

基金项目: 国家自然科学基金资助项目(20806033); 张家港市科技局项目(ZKS0904); 2010年度公益性行业(农业)科研专项项目(201003008-08)。

作者简介: 张银志(1975-),男,陕西汉中,高级工程师,主要从事食品安全检测研究。Email: yinzhizhang@yahoo.com.cn

\*通信作者: 孙秀兰(1976-),女,山东聊城人,工学博士,副教授,主要从事食品安全研究。Email: sxlzzz@yahoo.com.cn

食品,其中仍能发现 DON。鉴于 DON 对人畜的严重危害,我国要求动物饲料中的 DON 含量不得超过 2 mg/kg,而人类消费品中的含量不得超过 1 mg/kg<sup>[4]</sup>。

目前,检测 DON 的方法很多,主要有生物学检测法<sup>[5]</sup>、理化检测方法<sup>[6-7]</sup>、免疫化学检测法<sup>[8]</sup>。其中免疫化学检测法具有特异性高、敏感性强、快速方便、以及不需要昂贵仪器设备等优点,在微量毒素的检测中被广泛应用。其中运用最广的是酶联免疫方法(ELISA),ELISA 根据反应体系与检测体系之间的关系可以分为直接法和间接法。现报道的 DON 的 ELISA 方法都是间接竞争 ELISA,此方法虽然灵敏度高,但是精密度较差,且操作时间太长。相对而言,直接竞争 ELISA 操作简便、耗时少,而且特异性强,具有更广的应用前景。为了提高 DON 检测的精密度及操作的时间,作者在前期试验的基础上利用已制备得到的 DON 酶标抗原以及抗 DON 抗体,建立了检测食品中 DON 含量的直接竞争 ELISA 方法。

## 1 材料与方法

### 1.1 材料与仪器或材料与设备

呕吐毒素(DON)标准品:Alexis 公司产品;呕吐毒素(DON)酶标抗原:作者所在实验室制备;抗呕吐毒素(DON)抗体:作者所在实验室自制;底物显色液:江苏省微生物研究有限公司产品;其他试剂均为国产分析纯。MK3 酶标仪:赛默飞世尔(上海)有限公司产品;微量移液器:德国梅特勒公司产品。

### 1.2 实验方法

**1.2.1 DON 的直接竞争 ELISA 方法原理** 直接竞争 ELISA 方法测定原理见图 1。

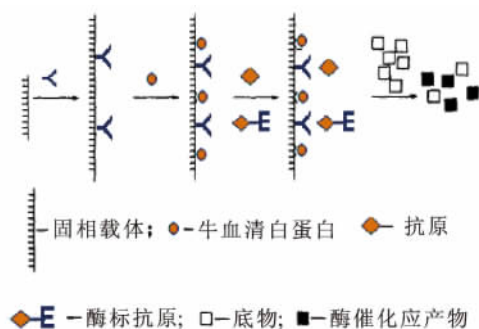


图 1 直接竞争 ELISA 方法过程

Fig. 1 Process of direct competitive ELISA method

首先抗体吸附于固相载体上,然后加入待测样品和相应酶标抗原,待测样品/DON 标准品、酶标抗原同时竞争固相载体上的抗体,当酶标抗原量一定时,待测样品/DON 标准品中 DON 含量越多,则被结合到抗体上的酶标抗原越少,发色反应就越弱,抑制率增高;反之,则发色反应增强,抑制率减低,从而可根据已知量 DON 的标准曲线和待检样品的抑制率,推算出待测物的浓度。

直接竞争 ELISA 法,其过程如下:

1)包被:以包被缓冲液(pH 9.6 的碳酸盐缓冲液)稀释抗体包被酶标板,100  $\mu\text{L}$ /孔,4  $^{\circ}\text{C}$  过夜或 37  $^{\circ}\text{C}$  反应 2 h,洗涤 3 次,拍干;

2)封闭:1 g/dL BSA-PBS 作封闭液,200  $\mu\text{L}$ /孔,37  $^{\circ}\text{C}$  封闭 1.5 h,洗涤 3 次,拍干;

3)加样:先后加入 DON 标准品/样品与酶标抗原各 50  $\mu\text{L}$ ,设空白对照,37  $^{\circ}\text{C}$  孵育 30 min;洗涤 4 次,拍干;

4)显色:先后加入 TMB 底物显色液 a、b 各 50  $\mu\text{L}$ /孔,37  $^{\circ}\text{C}$ ,15 min;

5)终止读数:加入 2 mol/L 浓硫酸终止显色反应,50  $\mu\text{L}$ /孔,用酶标仪测定其  $A_{450\text{ nm}}$  值。

### 1.2.2 最佳抗体包被浓度及酶标抗原浓度的筛选

分别将抗体与酶标抗原进行倍比稀释,通过竞争棋盘实验,选择抑制率好且  $A_{450}$  值在 1.0~2.0 之间的抗体及酶标抗原浓度作为最佳条件<sup>[9]</sup>。

**1.2.3 标准曲线的绘制及线性分析** 取标准 DON 质量浓度为 0、0.01、0.1、0.5、1、2.5、5、10、20、50、100、200 ng/mL;以吸光度比值  $B/B_0$  为纵坐标,100 倍 DON 标准溶液的浓度的对数值为横坐标拟合标准曲线。并进行标准曲线的线性分析<sup>[10]</sup>。

**1.2.4 交叉反应率的测定** 以不同浓度的 DON 的近似物 T-2 毒素、NIV、ZEN、AFB1 及 LC-MR 替代 DON,按照 ELISA 进行测定分别得到各自的抑制浓度  $IC_{50'}$ ,以 DON 的  $IC_{50}$  除以近似物的  $IC_{50'}$  得到交叉反应率( $IC_{50}/IC_{50'} \times 100\%$ ),根据交叉反应率的大小反映抗体的特异性<sup>[11]</sup>。

**1.2.5 灵敏度的测定** 最低检测限的测定方法<sup>[12]</sup>:测定阴性孔 10 次,计算阴性孔的平均值( $\bar{A}_{\text{阴}}$ )及标准方差(SD),以 A 值对应的 DON 浓度作为灵敏度,也称为最低检测限,计算公式为:

$$A = \bar{A}_{\text{阴}} - 2SD$$

**1.2.6 准确度的测定** 准确度是指测定值与真值

的符合程度,通常用加标回收率来表示<sup>[13]</sup>。

回收率(%)=

$$\frac{(\text{总的 DON 质量分数}-\text{原样品中的 DON 质量分数})}{\text{添加入 DON 的质量分数}}\times 100\%$$

选取呕吐毒素较常存在的玉米粉做加标实验。具体方法:向未经处理的样品中添加 DON 不同浓度的 DON,对样品进行处理后测定加标回收率。具体操作方法:准确称取 1.0 g 粉碎均匀的样品于三角瓶中,分别加入 0、100、1 000 ng/mL 的 DON 标准品各 1.0 mL,每个浓度平行做 3 次。使样品中 DON 浓度分别为 0、0.01、1 mg/kg,加入 10 mL 体积分数 10%甲醇提取液,振荡 10 min。以定量滤纸快速过滤,收集滤液,稀释倍数为 10。取适量滤液进行 ELISA 检测分析。

**1.2.7 精密度试验** 精密度<sup>[14]</sup>通常以批内和批间差异系数(CV)来表示。取 0、10、100 ng/mL 的 DON 标准品,进行批内和批间差异试验。批内差异试验即在相同条件下,同时按 ELISA 法测定吸光值,每个浓度在测定中做 4 个平行,测定各浓度的变异系数(CV),取其算术平均值,即得平均批内变异系数;批间差异试验即在连续 3 d 中,采用同一

条件,每天测定 1 次,每个浓度测定 2 个平行,计算各浓度在不同时间测得数据的变异系数(CV),取其算术平均值,即得平均批间变异系数。

**1.2.8 稳定性的测定** 稳定性是试剂盒的一个重要的评价指标,代表了试剂盒的货架期,而稳定性主要是由抗体及酶标抗原的稳定性所决定的。酶及抗体很容易发生热变性,从而导致检测方法稳定性差。将板条置于 37℃,7 d (37℃ 1 d 相当于 4℃ 两个月),期间每天测定 1 次,通过计算各浓度点的结合率变化及曲线的相关系数确定方法的稳定性。

**1.2.9 与商品化试剂盒的比较** 将自建的直接竞争酶联免疫方法与商品化试剂盒的间接竞争方法从反应时间、方法灵敏度、准确度、精密度以及稳定性方面进行对比,进行进一步的评价。

2 结果与分析

2.1 最佳包被抗体浓度及酶标抗原浓度的确定

竞争棋盘法确定最佳包被抗体浓度及酶标抗原浓度,实验数据见表 1。

表 1 棋盘试验结果

Tab.1 Results of chess board test

| 抗体质量浓度/<br>(μg/mL) | 酶标抗原质量浓度/(μg/mL) |       |       |       |       |       |
|--------------------|------------------|-------|-------|-------|-------|-------|
|                    | 200              |       |       | 100   |       |       |
|                    | 标准品质量浓度/(ng/mL)  |       |       |       |       |       |
|                    | 0                | 100   | 500   | 0     | 100   | 500   |
| 50                 | 2.494            | 1.435 | 1.436 | 2.144 | 1.285 | 0.53  |
| 20                 | 2.354            | 1.237 | 1.135 | 1.73  | 0.79  | 0.631 |
| 10                 | 2.186            | 1.526 | 1.187 | 1.554 | 2.186 | 0.513 |
| 抗体质量浓度/<br>(μg/mL) | 酶标抗原质量浓度/(μg/mL) |       |       |       |       |       |
|                    | 50               |       |       | 25    |       |       |
|                    | 标准品质量浓度/(ng/mL)  |       |       |       |       |       |
|                    | 0                | 100   | 500   | 0     | 100   | 500   |
| 50                 | 1.807            | 0.5   | 0.45  | 1.275 | 0.269 | 0.247 |
| 20                 | 1.616            | 0.447 | 0.437 | 1.039 | 0.309 | 0.216 |
| 10                 | 1.032            | 0.323 | 0.23  | 0.756 | 0.227 | 0.207 |

从表中数据可以看出酶标抗原质量浓度为 25 μg/mL,抗体质量浓度为 50 μg/mL 时数值适宜,抑制率最好,因此酶标抗原质量浓度为 25 μg/mL,抗体为 50 μg/mL 作为最佳条件。

2.2 标准曲线的绘制及线性分析

在最佳包被抗体质量浓度及酶标抗原质量浓度下,取取标准 DON 质量浓度为 0、0.01、0.1、0.5、1、2.5、5、10、20、50、100、200 ng/mL,按照直接竞

争 ELISA 方法进行测定,以吸光度比值  $B/B_0$  为纵坐标,100 倍 DON 标准溶液的质量浓度的对数值为横坐标拟合标准曲线,得到 DON 的竞争标准曲线,抑制曲线见图 2。

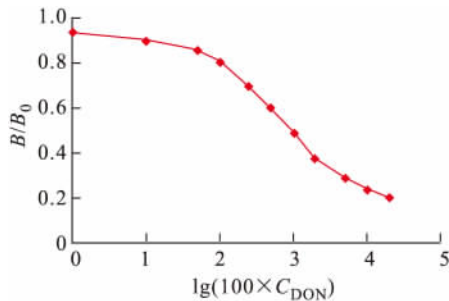


图 2 DON 的抑制率曲线  
Fig. 2 Inhibition curve of DON

由图 1 可以得到,DON 的质量浓度在 1~100 ng/mL 之间与  $B/B_0$  有良好的线性关系。截取 DON 质量浓度在 1~100 ng/mL 之间,以吸光度比值  $B/B_0$  为纵坐标,100 倍 DON 标准溶液的浓度的对数值为横坐标拟合标准曲线,得到线性回归方程为: $Y = -0.2969X + 1.3996, R^2 = 0.9955$ 。以  $B/B_0$  值接近 50% 所对应的 DON 的浓度为  $IC_{50}$ ,在图中, $B/B_0$  值接近 50% 时,DON 的质量浓度为 10 ng/mL,即所在实验室所得  $IC_{50}$  值为 10 ng/mL。该值恰好位于标准曲线的线性区间上。

2.3 特异性的测定

ELISA 检测方法的特异性由交叉反应试验来反映,作者研究了 DON 的结构类似物-T-2 毒素以及其他真菌毒素:玉米赤霉烯酮(ZEN)、黄曲霉毒素 B1(AFB1)、微囊藻毒素(MC-LR)对 DON 的交叉反应率,交叉反应率均小于 12%,说明该方法对于 DON 检测特异性很好。

2.4 灵敏度的测定

测定阴性孔 10 次,计算阴性孔的平均值( $\bar{A}_{阴}$ )及标准方差(SD),根据公式  $A = \bar{A}_{阴} - 2SD$  求得 A 值,以 A 值对应的 DON 质量浓度作为灵敏度,计算得到的最低检测限为 0.56 ng/mL。

2.5 精密度的测定

通过表 2 中数据计算得平均批内变异系数为 2.82%;平均批间变异系数为 14.54%。

2.6 准确度的测定

通过表 3 中数据计算得该方法对玉米粉的加标回收率在 80.2%~91.1%。

表 2 批内、批间变异系数测定结果

Tab. 2 Intra- and inter-assay variation coefficients

| 质量浓度/<br>(ng/mL) | 批内变异 ( $n=2$ )              |          | 批间变异 ( $n=4$ )              |          |
|------------------|-----------------------------|----------|-----------------------------|----------|
|                  | 测得值<br>( $\bar{X} \pm SD$ ) | CV/<br>% | 测得值<br>( $\bar{X} \pm SD$ ) | CV/<br>% |
| 0                | 1.06 $\pm$ 0.05             | 5.02     | 1.34 $\pm$ 0.19             | 14.35    |
| 10               | 0.64 $\pm$ 0.01             | 1.22     | 0.65 $\pm$ 0.09             | 13.80    |
| 100              | 0.26 $\pm$ 0.01             | 2.22     | 0.30 $\pm$ 0.05             | 15.48    |

表 3 样品添加回收率

Tab. 3 Recovery rate of DON in corn starch sample

| 样品   | 添加量<br>(ng/mL)              | 实测值/<br>(ng/mL) | 回收率/% |
|------|-----------------------------|-----------------|-------|
| 玉米淀粉 | 空白样品                        | 0.10            | /     |
|      | 加标 100 ng/mL<br>(稀释 10 倍)   | 8.10            | 80.2  |
|      | 加标 1 000 ng/mL<br>(稀释 10 倍) | 91.2            | 91.1  |

2.7 稳定性试验

37℃存放的试剂盒,在 0.5 d 后 0 孔吸光度值稍有下降,仅为 6.9%;1 d 后曲线的相关系数也由 0.979 降至 0.968,0 孔吸光值下降 24.4%,但  $A_{450\text{ nm}} > 1$ ,仍能满足测定的需要;但当达到 2 d 时,0 孔吸光值虽变化不大,但曲线已漂离,已不能用于测定。因此,推算此试剂盒能在 37℃稳定 1 d,及相当于 4℃下 2 个月。结果见图 3。

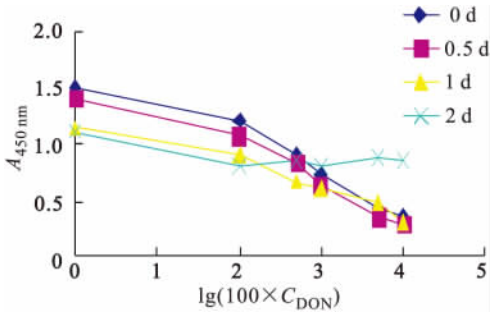


图 3 试剂盒稳定性测定  
Fig. 3 Stability of the kit

试剂盒稳定性由试剂盒中敏感试剂(抗体及酶标记物)决定,在储存过程中酶标抗原酶活降低使曲线 OD 值呈现下降趋势;而在 2 d 时曲线的飘离主要受抗体或酶标抗原变质的影响,下一步研究重点即是酶及抗体的保护。

### 3 结 语

作者研制的脱氧雪腐镰刀菌烯醇(DON)的直接竞争 ELISA 检测方法,工作条件为: DON 酶标抗原(DON-HRP)为 25  $\mu\text{g/mL}$ ;抗 DON 抗体工作终浓度为 50  $\mu\text{g/mL}$ 。该方法的检测范围 1~100 ng/mL,灵敏度达 0.56 ng/mL,半数抑制质量浓度 IC<sub>50</sub> 为 10 ng/mL;与 DON 类似物 T-2 毒素的交

叉反应率为 3%,与其他真菌毒素的交叉反应率也都小于 12%;玉米淀粉样品回收率在 80.2%~91.1%之间,平均批间变异<15%,平均批内变异<3%。

我国规定谷物及其制品中 DON 的限量标准为 1 mg/kg,作者建立的 DON 直接竞争 ELISA 方法的检测范围和灵敏度,均能满足我国对小麦、玉米等谷物及其制品中 DON 的定量检测。

### 参考文献(References):

- [1] Vesonder R F, Ciegler A, Burmeister H R. Acceptance by swine and rats of corn amended with trichothecenes[J]. **Applied and Environmental Microbiology**, 1979, 38(2): 334—336.
- [2] Bosch U, Mirocha C J, Abbas H K, et al. Toxicity and toxin production by *Fusarium* isolates from New Zealand[J]. **Mycopathologia**, 1989, 108: 73—79.
- [3] Young J C, Fulcher R G, Hayhoe J H, et al. Effect of milling and baking on deoxynivalenol (vomitoxin) content of eastern Canadian wheats[J]. **J Agric Food Chem**, 1984, 32 (3): 659—664.
- [4] 中华人民共和国卫生部. 小麦、面粉、玉米及玉米粉中脱氧雪腐镰刀菌烯醇限量标准[S]. GB16329-1996.
- [5] 陈怀谷, 王永生, 王裕中. 应用赤霉毒素-芽鞘生测法鉴定小麦品种的抗赤霉病性[J]. **江苏农业科学**, 1990(6): 23—24.  
CHEN Huai-gu, WANG Yong-wen, WANG Yu-zhong. Identification of wheat gibberellic disease by red mold toxin-bud scabbard biometric method[J]. **Jiangsu Agricultural Science**, 1990(6): 23—24. (in Chinese)
- [6] Childress W L, Krull I S, Selavka C M. Determination of deoxynivalenol in wheat by high performance liquid chromatography with photolysis in electrochemical detection (HPLC-HV-EC) [J]. **Journal of Chromatographic Science**, 1990, 28, (2): 76—82.
- [7] Goyarts T, Danicke S. Bioavailability of the *Fusarium* toxin deoxynivalenol (DON) from naturally contaminated wheat for the pig[J]. **Toxicol Lett**, 2006, 1;163(3):171—82.
- [8] Larsen J C, Hunt J, Perrin I, et al. Workshop on trichothecenes with a focus on DON; summary report[J]. **Toxicology Letters**, 153 (1): 1—22.
- [9] 刘红, 曾振灵, 杨桂香, 等. 恩诺沙星 ELISA 快速检测方法的建立[J]. **中国兽药杂志**, 2006, 40(11): 13—15.  
LIU Hong, ZENG Zhen-ling, YANG Gui-xiang, et al. To establish the ELISA method for detecting enrofloxacin residues [J]. **Chinese Journal of Veterinary Drug**, 2006, 40(11): 13—15. (in Chinese)
- [10] McCaughey WJ, Crooks S. Determination of sulfadimidine in animal feedstuffs by an enzyme-linked immunosorbent assay [J]. **Food Additives and Contaminants**, 1990. 7(2): 259—264.
- [11] Mikhailov A H, Meriluoto J, et al. Production and specificity of mono and polyclonal antibodies against microcystins conjugated through N-methyldehydroalanine[J]. **Toxicon**, 2001. 39(4): 477—483.
- [12] 冯仁丰. 分析灵敏度(检测限)[J]. **上海医学检验杂志**, 2002, 17: 133—136.  
FENG Ren-feng. Analytical sensitivity (detection limit)[J]. **Shanghai Journal of Medical Laboratory Sciences**, 2002, 17: 133—136. (in Chinese)
- [13] 高雷, 黄飏, 李秋萍, 等. 脱氧雪腐镰刀菌烯醇时间分辨免疫法的建立[J]. **食品科学**, 2009, 30(20): 398—402.  
GAO Lei, HUANG Biao, LI Qiu-ping, et al. Ultrasensitive Time-resolved fluoroimmunoassay of Deoxynivalenol[J]. **Food Science**, 2009, 30(20): 398—402. (in Chinese)
- [14] 韩丹, 吴梅, 邓安平, 等. 酶联免疫吸附分析法测定食品中的苏丹红 I 号[J]. **分析化学**, 2007, 35(8): 1168—1170.  
HAN Dan, WU Mei, DENG An-ping, et al. A Sensitive enzyme linked immunosorbent assay for the analysis of sudan I in food samples[J]. **Chinese Journal of Analytical Chemistry**, 2007, 35(8): 1168—1170. (in Chinese)