

玉米和花生中黄曲霉素 O_x 酶联 免疫快速分析方法

张俊亭 陈国光 李治祥 张爱虹 张晓佚

o 农业部环境保护科研监测所, 天津 *zxxZxp*

摘 要 将黄曲霉素 O_x 衍生成胺氧乙酸肟,然后分别同牛血清白蛋白和辣根过氧化物酶进行化学交联而制得结合物。前者用来免疫新西兰大白兔,后者用作免疫反应的示踪物。将所得抗体和示踪物在免疫反应中进行浓度优化,开发出了 ETO_x 酶联免疫分析直接竞争抑制法。用所建立的方法能够准确、快速地检测玉米和花生中黄曲霉素 O_x 的含量。 ETO_x 在磷酸盐—吐温缓冲液中的最低检测限为 0.01 ng/ml ;在玉米和花生中的最低检测限均为 0.05 ng/g 。

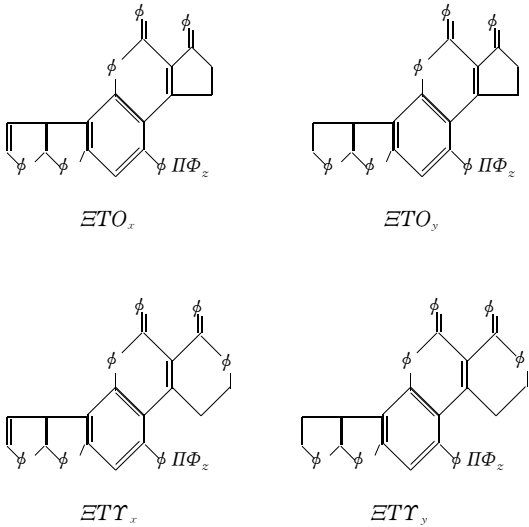
关键词 ETO_x 酶联免疫分析 玉米 花生

黄曲霉毒素 Aflatoxin 是由霉菌产生的一类有毒的次级代谢产物。于1963年研究火鸡 ϵ 病时首次被发现^[1]。此后不断的研究表明这类毒素具有高度致癌性,对动物有着极大的危害^[2]。这类毒素在自然界中分布广泛,普遍存在于食品和粮食中,特别是花生、花生酱、大豆、玉米等农产品中。由于黄曲霉毒素在人体中不易被分解代谢,即使是误食低浓度的黄曲霉毒素,累积到一定数量后也会引发癌症。

为了降低和消除黄曲霉素的污染,需要有快速、经济和灵敏的检测方法。近些年来开发出的免疫学分析方法具有许多突出的特点,如分析费用低,重现性好,灵敏度高,短时间内能处理大量样品和易于普及等^[2, 46]。酶联免疫分析可分为直接竞争抑制法和间接竞争抑制法。直接法的优点是操作步骤少,反应时间短,适合开发非常快速的检测分析方法。

现已鉴定出的黄曲霉毒素的种类有四种,其各自的结构如图 x 所示。由于 ESTO_x 在此类毒素中毒性最强,存在范围广,相对含量

亦最大,我们选用它作抗原来制备抗体,期望获得准确而灵敏的测定 ETO_x 的方法。为了使检测更加快速,我们将用酶联免疫分析中直接竞争法的原理来开发 ETO_x 的速测



图x 黄曲霉素的化学结构

方法。

x 材料与方法

xw 材料与试剂

xwuw 试剂

ETO_x 、 ETO_y 、 $ET\gamma_x$ 和 $ET\gamma_y$ ，胺氧乙酸盐酸盐，辣根过氧化物酶 $\phi\phi\phi$ ，牛血清白蛋白 ϕOs ϕp ， $sXT \in E$ ；卡介苗，卫生部北京生物制品研究所；凯松，北京营养源研究所；其余的试剂均为分析纯。

xwuy 材料

ZI 孔聚乙烯微孔板，透析袋。

xwuw 仪器

移液器， $OX\phi - \phi EP ABv$ 型微孔读板机，恒温箱，洗板机，冻干机，旋转蒸发器，小型回流反应玻璃仪器，磁力搅拌器，振荡器，离心机，粉碎机，低温冰箱，普通冰箱。

xuy 抗原的合成

xuyuw ETO_x 脂衍生物的制备

脂衍生物的制备和同蛋白质的偶联所采用的方法同 $P\sigma\xi^2$ 等人的方法^[Bk]。

xuyuy $ETO_x - Os \in$ 包被抗原的制备

取上述 ETO_x 脂的衍生物 $xy \vdash v$ ，溶于 $z \iota B \vdash \partial$ 二氧六环中。搅拌条件下向上述溶剂中加入 $\gamma w \mu \partial$ 三正丁胺，冷却到 $xy \text{ } ^\circ C$ ，搅拌反应 $\gamma w \vdash \chi^2$ 。再向其加入冷冻后的氯甲酸异丁酯 $xw \mu \partial$ ，稳定在 $xy \text{ } ^\circ C$ 下再搅拌反应 $\gamma w \vdash \chi^2$ 。最后，向上述反应物中加入预冷的牛血清白蛋白溶液 $B \vdash \partial$ （水 v 二氧六环 $s \gamma v \gamma syv$ x ；共含 $\phi s \in z B \vdash v$ ），立即用 $w \iota x \vdash \vdash \partial$ $\partial \xi \phi \phi$ 调 Φ 值至 $E \iota w$ ，把混合物在 $A \text{ } ^\circ C$ 冰箱中搅拌反应 $A \phi$ 。反应产物在 $A \text{ } ^\circ C$ 冰箱中透析 $z \rho$ ，然后冷冻干燥。

xw 抗体的生产与纯化

用 $ETO_x - Os \in$ 结合物作为免疫抗原，注射免疫 z 只新西兰大白兔。每个月免疫一次，第一次使用完全佐剂，以后使用不完全佐剂。从第 z 个月起分离血清，并测定效价。当抗体的效价达到一定水平后，大量采血。纯

化方法参照 $\Phi\sigma\sigma\sigma^{68}$ 方法^[GK]进行。

xwA $ETO_x - \Phi\phi\phi$ 结合物的合成

本结合物的合成参照 $\phi\sigma\tau^8 \omega\xi$ 人所用的方法^[BΔk]。

xwB 滴度的测定

将纯化好的 ETO_x 抗体用 $w \iota x \vdash \vdash \partial$ $\Phi Z \iota \Gamma$ 的碳酸盐缓冲液作系列稀释。按每孔 $x B v \mu \partial$ 将上述溶液加入到预洗好的 ZI 孔聚乙烯板中， $A \text{ } ^\circ C$ 静止过夜。然后用 $w \iota x \gamma \vdash \vdash \partial$ $\Phi \Delta \iota y$ 磷酸盐—吐温缓冲液 $\phi \phi Os \alpha p$ 洗 A 次。把 $ETO_x - \Phi\phi\phi$ 结合物用 $w \iota x \gamma \vdash \vdash \partial$ $\Phi \Delta \iota y \phi Os \alpha$ 稀释 $\gamma \iota \alpha v$ 倍，加 $x B v \mu \partial v$ 孔到已包被好抗体的板上，每个浓度重复 z 次。将微孔板在 $z \Delta \text{ } ^\circ C$ 温育 $z \phi$ 后，用 $\phi Os \alpha$ 洗板 B 次，甩干。每孔再加入邻苯二胺底物溶液 $x B v \mu \partial$ ， $z \Delta \text{ } ^\circ C$ 温育 $z w \vdash \chi^2$ 。然后，每孔用 $x \vdash \vdash \partial$ $\Phi_y s \phi_A$ 溶液 $A v \mu \partial$ 终止反应，上机测定光密度。

xwI Γ 标准曲线的制备

xwIw $\Sigma X \Xi$ 方法

将 ETO_x 标样用 $\phi Os \alpha$ 按 B 中的方法系列稀释。在包好纯化抗体 $\phi z \iota \alpha v$ 倍 ρ 的聚乙烯板上每孔加上上述稀释液 $\Delta B \mu \partial$ ，每个浓度重复三次。最后一排孔中加入 $\phi Os \alpha \Delta B \mu \partial$ 作对照。再把 $ETO_x - \Phi\phi\phi$ 混合物用含 $w \iota B \% Os \in$ 的 $\phi Os \alpha$ 稀释 $x \iota \alpha v$ 倍，每孔加入 $\Delta B \mu \partial$ 。将板在 $z \Delta \text{ } ^\circ C$ 温育 $y \phi$ 后，用 $\phi Os \alpha$ 洗 B 次，甩干。每孔加入邻苯二胺显色液 $x B v \mu \partial$ ， $z \Delta \text{ } ^\circ C$ 再温育 $z w \vdash \chi^2$ ，然后用 $x \vdash \vdash \partial$ $\Phi_y s \phi_A$ 终止反应后上机测定。

另取 ETO_y 、 $ET\gamma_x$ 和 $ET\gamma_y$ 重复上述过程，考察交互反应的强度。

xwIuy 抑制率的计算方法

根据每个浓度 ETO_x 标样在 $A Z \iota v^2 \vdash$ 的平均吸光值，然后按下式计算其抑制率 H

$$\text{抑制率} \phi l \quad p K x \iota \alpha v t \quad \frac{\text{标样吸光值}}{\text{空白吸光值}} \times 100$$

以抑制率为纵坐标，标样浓度的对数为横坐标作图，可得抑制曲线。

xuΔ 添加试验

先将整粒玉米或花生粉碎,按适宜的浓度加入 ETO_x 标样的甲醇溶液,混合均匀。凉干后,称取 Bv 样品加入到 $Bv \div \partial$ 三角瓶中,再向瓶中加入 $yB \div \partial$ 提取溶剂 ϕ 甲醇:水:二甲基甲酰胺, $\gamma v \gamma \Delta w y Z v x p$ 。先将三角瓶在振荡器上振荡 $xw \div \chi^2$,然后静止 $B \div \chi^2$,上清液用滤纸过滤。取一定量滤液用 $\phi Os \alpha$ 按体积稀释 xav 倍后,用所建立的 ΣXE 方法测定。

y 结果与讨论

yw 抗体的滴度

当 $ETO_x - \Phi_Q \phi$ 的稀释倍数为 yav 倍时,以抗体的稀释倍数作横坐标,把测定的结合率为纵坐标,所绘制出的滴度曲线见图y。

图y ETO_x 抗体的滴度曲线

尽管图y中所示的抗体的滴度在 $xy Eav$ 倍左右,但由于抗体所导致的光密度随着稀释急剧下降,所以试验时所采用的工作浓度都比较低。通过优化反应浓度,将 $ETO_x - \Phi_Q \phi$ 稀释倍数选在 yav 倍,而将包被抗体的浓度选在 zav 倍来进行试验比较合适。

yuy ETO_x 酶联免疫测定

将抗体稀释 zav 倍, $ETO_x - \Phi_Q \phi$ 稀释 yav 倍进行抑制试验。以所得的抑制率为纵坐标, ETO_x 浓度的对数值为横坐标,绘制标准曲线见图z。

图z ETO_x 标准抑制曲线

由图z可以看出, ETO_x 最大抑制率为 $ZB\%$,方法的最低检测限为 $wuA \div v v \div \partial$,完全能满足快速检测黄曲霉素的要求。

yw 交互反应强度

为了检验方法的特异性(抗其它化学物质干扰的能力),我们用所开发的方法测定 ETO_x 结构类似物 ETO_y , $ET\gamma_x$ 和 $ET\gamma_y$,求得它们抑制 $Bv\%$ 时所需的浓度。通过同 ETO_x 相比较,得到交叉反应的强度。 ETO_y , $ET\gamma_x$ 和 $ET\gamma_y$ 的交互反应强度分别为 $wy x \%$, $x E u E v \%$ 和 $B u \Gamma w \%$ 。由于结构类似物交互反应强度比较低,再加上在自然界中的浓度要远远低于 ETO_x ,它们从总体上不会干扰测定。因此,所开发的 ΣXE 方法对 ETO_x 具有良好的特异性,能够准确地测定微量的 ETO_x 。

y uA 添加试验

同一浓度的 ETO_x 分别添加到玉米和花生中,重复 z 次,取其回收率平均值。回收率的平均值能够揭示所采用的提取方法对添加到样品中 ETO_x 的提取效率、以及所开发的方法承受提取物干扰的能力。高而稳定的回收率值是一种好的分析方法所必须具备的。

y uAw 玉米添加试验

如表x所示,试验表明,当玉米的提取液在稀释 xav 倍以上时,其它的杂质对测定不构成干扰,可以直接用 $\phi Os \alpha$ 作标准曲线来实现测定。由于玉米中允许的残留量为 Bv

表 x ETO_x 在玉米中的添加回收率

ΣTO_x 添加浓度	实测浓度	回收率
$o \pm v \text{ } \omega \mu p$	$o \pm v \text{ } \omega \mu p$	$o \text{ } \% p$
$A\alpha\alpha\alpha\alpha$	$zEuA \pm \Delta ty$	$ZT \pm xE$
$A\alpha\alpha\alpha\alpha$	$z\Delta Bt\Gamma \pm \Delta EuA$	$Z\alpha \pm xy$
$A\alpha\alpha\alpha\alpha\alpha$	$z\Gamma Zx uA \pm \Gamma ZZ uA$	$Zy \pm xE$

$v/\omega v$ ，而所开发的方法对玉米的最低检测限为 $kx^2 v/\omega v$ ，无论在方法的回收率和最低检测限方面，都可完全满足玉米中微量 ETO_x 分析的需要。

3.2.2 花生添加试验

如表 y 所示,同玉米样品一样,花生的提取液在稀释 xav 倍以上时,杂质对测定也不会构成干扰。因此,可以直接用 $\phi Os \alpha$ 作标准曲线来实现测定。花生中允许的残留量为 $Bv^2 v / \omega v$, 而所开发的方法的最低检测限为 $Ax^2 v / \omega v$, 也可满足花生中 ETO_x 分析的需要。

参考文献

$$\begin{array}{l} x \quad \vartheta \circ s \circ \phi \chi_8 \circ T \circ s \circ \phi \eta \Omega s^{003} \circ \Psi \circ s \circ s \xi^0 \rho \circ s^{28} \circ \Omega \circ s^{78} \circ \xi^0 \circ u \circ \xi^{89} \circ \phi \circ s \\ xZT \circ \Theta ZBH u \circ y \circ x u \circ z \\ y \quad O \circ s^{80} s^{60} \circ \delta \circ \Phi \circ u \circ \epsilon \circ s^{3832} \circ \chi^2 \circ \circ \circ \phi^{60} \circ \phi \pi \xi^7 \circ s \circ X i u \circ u \circ \Phi \circ u \circ s \circ \rho \circ s \\ \Sigma \circ \circ \circ \sigma \circ \chi^6 \circ s \circ \chi^2 \circ s^{28} \circ \chi^2 \circ \phi \circ \circ \circ \chi^2 \circ \phi \circ \circ \circ \chi^2 \circ u \circ I \circ s \circ 1 \circ 4 \xi^2 \circ s \circ \Xi \circ 1 \circ 78 \circ \circ \rho \xi^1 \circ s \end{array}$$

表 y ETO_x 在花生中的添加回收率

ETO_e 添加浓度	实测浓度	回收率
$o \pm v \text{ } \omega p$	$o \pm v \text{ } \omega p$	$o \text{ } \% p$
$A\alpha\alpha\alpha\alpha$	$z\Delta tE \pm \Gamma uy$	$ZB \pm x\Gamma$
$A\alpha\alpha\alpha\alpha\alpha$	$z\Delta E uA \pm B\Delta uA$	$ZB \pm xA$
$A\alpha\alpha\alpha\alpha\alpha\alpha$	$z\Gamma\alpha\alpha\alpha\alpha y \pm \Gamma z Bu\Gamma$	$Zx \pm x\Gamma$

$$xZ\Delta AH - yE$$

[illegible]

作者简介

张俊亭, 副研究员。xZZA 年浙江农业大学植保系农药残毒研究方向硕士研究生毕业。在农业部环境保护科研监测所的早期工作以农药和天然毒物的残留分析为主。后转向无公害农药和其它绿色技术的开发与研究, 并有多项成果获国家专利, 现已发表论文yw 余篇。

欢迎订阅 $xZZZ$ 年《生态农业研究》

《生态农业研究》是由中国科学院石家庄农业现代化研究所和中国生态经济学会共同主办的生态学与农业相结合的国家级综合性学术期刊,由中国科学院科学出版基金资助、科学出版社出版,系中国科学院引文数据库来源期刊,河北省优秀期刊。本刊旨在探索与研究生态农业理论、方向和内容等,推动学科发展。主要刊登具有创造性的生态农业研究论文、研究技术报告^o包括理论与应用研究、生态农业工程技术与适用技术等^p,报道国内外生态农业最新研究成果、试验方法与手段、学术动态和生态农业建设典型经验。适于国内外从事生态学、生态经济学、农、林、牧、副、渔、资源与环境保护等科技人员、大中专院校

有关师生和管理工作者阅读。

本刊 1982 年创刊, 国内外公开发行, 刊号 X83.9/3844-Ey9Z5 II9 22-xx-1976, 季刊, 季末月出版, 16 开本, 450 页。定价 15 元/册, 全年共 45 元, 全国各地邮局均可订阅, 邮发代号 36-198E。漏订者可直接向本刊编辑部补订, 本刊现有 1982 至 1984 年合订本均为 45 元/套(含邮资), 1985 年合订本将于 1986 年初装订, 欢迎订阅。

地址H河北省石家庄市槐中路yET 号

《生态农业研究》编辑部

电话 $HowxxpBExExaw\Delta$

邮编 *HeBei**yx*