

小麦中脱氧雪腐镰刀菌烯醇免疫 吸附测定方法的研究*

阳传和 刘 畅 罗雪云 计 融 冉 陆 张 楠 张 靖

(卫生部食品卫生监督检验所 北京 100021)

摘要 用B淋巴细胞杂交瘤技术制备了能稳定分泌抗脱氧雪腐镰刀菌烯醇(DON)单克隆抗体的杂交瘤细胞株,命名为3D7。3D7的亚类为IgG₁。运用该抗体,建立了检测小麦中DON的间接竞争性酶联免疫吸附测定法。该法最低检出量为5ng/ml,敏感范围为5-1000ng/ml;平均回收率为96.6-107.3%;精密度为6.2-13.3%。运用该方法,检测了10份小麦样品,均为阳性,其含量为56.4-1 002.0 ppb。

关键词 单克隆抗体,脱氧雪腐镰刀菌烯醇,小麦

脱氧雪腐镰刀菌烯醇(Deoxynivalenol, DON)是一种化学结构类似于倍半萜烯的化合物(图1),最早于1970年在日本秀川县引起人畜中毒的赤霉病的大麦中分离、纯化得到。1973年 Versonder 从引起猪拒食、呕吐的玉米中分离到此毒素,故俗称呕吐毒素(Vomitoxin)。该毒素为剧毒,大鼠经口饲LD₅₀为7.3mg/kg^[1]。

DON为无色针状结晶,易溶于水和极性有机溶剂,对热抵抗力较强,加热110℃1小时以上才能破坏。食品(主要是小麦、大麦、玉米)中DON的污染是非常普遍的。在自然感染赤霉病的麦类和霉变小麦中毒的样品中均检出高含量的DON^[2-4]。

由于DON对人畜具高度危害性,从70年代中期开始,世界上主要产麦国纷纷开展了对该毒素的研究。建立了高压液相色谱、气相色谱和薄层色谱等化学分析方法。80年代中后期,一些研究者又开展了免疫检测方法的研究^[5-8]。我们应用B淋巴细胞杂交瘤技术,制备出抗DON特异性强的单克隆抗体,建立了检测小麦中DON的间接ELISA方法,现报道如下。

1 材料和方法

1.1 器材

CO₂培养箱(美国 Queue 仪器公司);洁净工作台(北京半导体设备一厂);植物粉碎机(河北黄骅齐家五金厂);511型酶标分析仪(上海第三分析仪器厂);96孔、24孔细胞培养板及96孔酶标微孔板(美国 Gibco 公司);玻璃器皿等。

1.2 试剂

脱氧雪腐镰刀菌烯醇、T-2毒素(T-2toxin)、T-2三醇(T-2triol)、T-2四醇

* 国家自然科学基金资助课题。

本文于1992年9月8日收到。

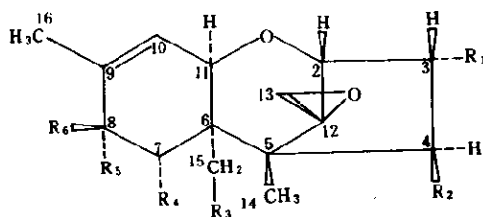


图 1 供试的 8 种单端孢霉烯族化合物的分子结构式及其支链基团

Fig. 1 Basic chemical structure and side-chain residues of all trichothecenes

毒素 Toxin	R ₁	R ₂	R ₃	R ₄	R ₅	R ₆
T-2	-OH	-OAc	-OAc	-H	-Olsv	-H
T-2 triol	-OH	-OH	-OH	-H	-Olsv	-H
T-2 tetraol	-OH	-OH	-OH	-H	-OH	-H
Neosolaniol	-OH	-OAc	-OAc	-H	-OH	-H
Diacetoxyscirpenol	-OH	-OAc	-OAc	-H	-H	-H
Verrucarol	-H	-OH	-H	-OH	-H	-H
Fusarenon-X	-OH	-OAc	-H	-OH	=O	
Deoxynivalenol	-OH	-H	-OH	-OH	=O	

OAc. acetyl group 乙酰基(-OCOCH₃)

Olsv. isovaleroxy group 异戊酰氧基(-OCOCH₂CH₂CH₃)

(T-2 tetraol)、二醋酸蕈草镰刀菌烯醇(Diacetoxyscirpenol, DAS)、牛血清白蛋白(BSA)、人血清白蛋白(HSA)、水溶性碳二亚胺、福氏佐剂(完全和不完全)、丁基硼酸、各种兔抗鼠 Ig 分型亚类(美国 Sigma 公司)、新茄病镰刀菌烯醇(Neosolaniol)、镰刀菌酮-X(Fusarenon-X)(日本和光纯药工业株式会社)、疣孢漆斑烯醇(Verrucarol)(以色列 Makor 公司)、兔抗鼠 IgG 与辣根过氧化酶结合物(北京生物制品研究所)、所有其他试剂均为分析纯。

ELISA 缓冲液系统及毒素标准溶液配制, 见参考文献[4]。

1.3 人工抗原的制备

半抗原 DON 与载体蛋白 BSA 和 HSA 的联接按 Casale 等^[8]的方法进行。

1.4 免疫动物

BALB/C 雌性小鼠, 6-8 周龄, 用人工抗原 DON-HSA 行多次免疫。取 500μg/只的免疫原溶于 0.3ml 0.9%(W/V)生理盐水中, 并与同体积完全福氏佐剂混匀, 于小鼠四肢腋下皮下注射 0.1ml, 同时腹腔注射 0.2ml。15 天后, 行第二次免疫, 方式、剂量均同第一次免疫, 只是免疫原用不完全佐剂进行乳化。再过 15 天后, 用 200μg/只的 DON-HSA 溶于 0.2ml 的 0.9%(W/V)生理盐水中, 尾静脉注射。3 天后, 取脾融合。

1.5 细胞融合

免疫小鼠脾细胞与骨髓瘤细胞 SP2/0 以 1:10 混合, 用 50% 聚乙二醇(PEG, MW 1000)作融合剂。融合细胞悬于含 20% 胎牛血清的 HAT 选择培养基内, 分种于加有 BALB/C 小鼠腹腔渗出细胞作滋养层的 96 孔培养板中, 置 5%CO₂、37℃ 细胞培养箱中培养。当镜检杂交瘤克隆生长达到 1/2 视野时, 取上清液进行筛选, 阳性者及时用有限稀释法进行克隆化。

1.6 杂交瘤筛选及抗体检测

杂交瘤筛选用竞争性 ELISA 间接法进行(见下文);培养上清液及腹水中抗体滴度的检测,用非竞争性 ELISA 间接法进行^[10]。

1.7 抗体的特性

用常规方法(小鼠体内法)制备单克隆抗体腹水,用紫外分光光度计测定腹水中的蛋白浓度;用免疫双扩散法分析抗体的亚类,用竞争 ELISA 间接法检测抗体的特异性。

1.8 小麦中 DON 的提取与净化

见参考文献[9],同谷物中 T-2 毒素的提取与净化。

1.9 竞争性 ELISA 间接法

1. 用 DON-BSA(20 μ g/ml)包被酶标微孔板,每孔 100 μ l,4 $^{\circ}$ C 过夜。
2. 酶标板用 PBS-T 洗 3 次,每次 3 分钟后,加入不同浓度的 DON 标准溶液(制作标准曲线)或样品提取液(检测样品)与抗体溶液(1:2000)的混合液(1:1,每孔 100 μ l,该混合液应于使用的前一天配好,4 $^{\circ}$ C 过夜备用),置 37 $^{\circ}$ C 1 小时。
3. 酶标板洗 3 次,每次 3 分钟后,加入酶标二抗,每孔 100 μ l,37 $^{\circ}$ C 1.5 小时。
4. 同上述洗涤后,加入底物溶液,每孔 100 μ l,37 $^{\circ}$ C 30 分钟。
5. 用 1mol/l 的硫酸终止反应,每孔 50 μ l,于 450nm 处测定 OD 值。

1.10 计算

$$\text{DON 浓度 (ng/g)} = C \times \frac{V_1}{V_2} \times D \times \frac{1}{M}$$

式中:C 为酶标微孔板上所测得的 DON 的量(ng),根据标准曲线求得;

V_1 为样品提取液的体积(ml);

V_2 为滴加样液的体积(ml);

D 为稀释倍数;

M 为样品质量(g)。

2 结 果

2.1 细胞融合及抗体检测

用 DON-HSA 免疫小鼠,获得了较好的免疫应答。细胞融合后,75.6%的孔(218/288)长出杂交瘤细胞株,其中抗体检测阳性孔为 6 个,后经三次亚克隆后,建立了一个稳定分泌抗 DON 单克隆抗体的杂交瘤细胞株,命名为 3D7。

克隆化三次后的 3D7 细胞株,其培养物上清液和 BALB/C 小鼠腹水的抗体滴度,用非竞争性 ELISA 间接法检测,分别为 1:4096 和 1:20 万。

腹水经辛酸-一饱和硫酸铵盐析纯化后,紫外分光光度计测其 260nm 和 280nm 处的 OD 值,其纯化腹水中的蛋白浓度为 4.9mg/ml。

2.2 抗体特性

3D7 杂交瘤细胞株分泌的抗体,免疫双扩散结果的沉淀线表明为 IgG₁。

特异性检测: DON 等 8 种单端孢霉烯族化合物(分子结构及其支链基团见图 1), 通过竞争性 ELISA 间接法测定结果表明, 除 DON 外, 与共试的其他毒素无交叉反应, 说明该抗体有较强的特异性。

2.3 标准曲线

DON 标准品, 用 20% 甲醇的 PBS 配成不同浓度, 用竞争性 ELISA 间接法测得的标准曲线如图 2。

运用该抗体, 建立的竞争性 ELISA 间接法, 对 DON 的最低检出量为 5ng/ml, 检测的线性范围为 5—1000ng/ml。

2.4 加标回收

于正常的小麦样品中(即经检测 DON 含量为零), 加入一定量的 DON 系列标准溶液, 经提取后, 用本法测得的回收结果见表 1。

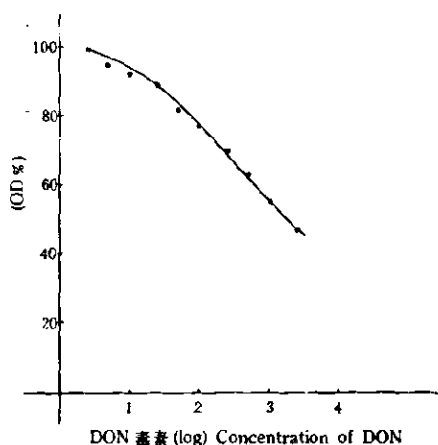


图 2 DON 标准曲线(间接 ELISA)

Fig. 2 Standard curves by indirect competitive ELISA for DON

表 1 小麦中 DON 的加标回收结果

Table 1 ELISA recovery of DON from artificially contaminated wheat flour sample

DON 加入量 DON spiked (ppb)	回收结果 Recovery ($\bar{X} \pm SD$)						平均 回收率	平均 精密度
							Mean recovery	Mean CV
	ppb	%	ppb	%	ppb	%	(%)	(%)
5	5.0 ± 0.5	109 ± 10.0	5.6 ± 1.1	112 ± 19.6	4.5 ± 0.5	89.2 ± 11.4	106.4 ± 13.9	13.3
10	7.9 ± 0.5	79 ± 6.3	8.9 ± 1.3	89.1 ± 1.6	12.4 ± 2.2	121.0 ± 17.7	97.1 ± 12.9	13.2
100	112.2 ± 5.7	112.2 ± 5.1	100.0 ± 8.9	100.0 ± 8.9	109.6 ± 9.6	109.6 ± 8.8	107.5 ± 7.6	7.1
500	446.7 ± 10.8	89.3 ± 2.4	501.2 ± 24.3	100.2 ± 4.8	501.2 ± 54.5	100.2 ± 10.6	96.6 ± 6.0	6.2
1000	831.7 ± 56.3	83.1 ± 6.8	1122.0 ± 45.0	112.2 ± 4.0	1122.0 ± 209.9	112.2 ± 18.7	102.5 ± 9.8	9.5

由表 1 可知, 本法的平均回收率为 96.6—107.3%, 精密度(CV%)为 6.2—13.3%。

2.5 小麦中 DON 含量检测

应用本文建立的方法, 对采自辽宁、上海、陕西、湖北、安徽等地的 10 份小麦进行了 DON 含量的测定, 结果见表 2。

由表 2 可知, 供检的 10 份小麦样品中, 均检出 DON, 其含量为 56.4—1002.0 ppb。

平均含量为 436.3 ppb。

表 2 小麦中 DON 的检测结果

Table 2 Detection Values of DON in wheat samples

样 品 Samples	DON 含量 Concn of DON (ppb)	采 集 地 Sampling areas
1	224.4	上海青浦 Shanghai Qingpu
2	355.6	安徽巢湖 Anhui Chaohu
3	282.5	安徽巢湖 Anhui Chaohu
4	447.7	安徽巢湖 Anhui Chaohu
5	399.1	安徽和县 Anhui Hexian
6	632.5	陕西宝鸡 Shaanxi Baoji
7	399.1	辽宁新民 Liaoning Xinmin
8	56.4	湖北荆州 Hubei Jingzhou
9	1002.0	辽宁新民 Liaoning Xingmin
10	563.7	江苏金湖 Jiangsu Jinhu

3 讨论

在单端孢霉烯族化合物中,DON 由于在分子结构上存在着三个羟基,为复合抗原(毒素与载体蛋白的结合物)的制备带来了一定的困难。Zhang 等首次建立了 DON 的免疫检测方法,他们将 DON 乙酰化,合成了 3 个乙酰基的 DON(Tri-Ac-DON),并制备出特异性抗血清,建立了 DON-3 醋酸酯的放射免疫测定法(RIA)和酶联免疫吸附测定法(ELISA)^[6-7]。由于这些方法在检测样品过程中应事先将样品乙酰化,测定过程比较繁琐,准确性较差。1988 年,Casale 等^[8]在制备复合抗原的过程中,首先将 7 位和 15 位上的羟基用丁基硼酸进行封闭,形成环状内酯,然后将 3 位上的羟基转变成羧基,再与载体蛋白进行共价结合,最后去除环状内酯物质。他们通过该法制备出抗 DON 的单克隆抗体,进而建立了 ELISA 方法,检测谷物中的 DON 含量,其线性范围为 10—250ng/检测孔(0.2—5.0μg/ml)。我们应用上述复合抗原的制备方法,并辅之以大剂量(500μg/只/次)的免疫程序,制备出高特异性的抗 DON 的单克隆抗体,所建立的竞争性 ELISA 间接法,最低检出量可达 5ppb。明显优于 Casale 等报道的方法。

本文建立的方法,其最低检出量达 5ppb,检测的线性范围为 5—1 000ppb,在 5、10、100、500、1000ppb5 个水平上的回收试验,其回收率在 96.6—107.3%,精密度为 6.2—13.3%。检测灵敏度均高于气相色谱^[11]、高压液相色谱^[12]和薄层色谱^[13]。且 ELISA 法简单、特异、灵敏、快速,易于在基层卫生防疫、食品检验、商品检验等部门推广使用,尤其是大量样品的筛选。目前,我国谷物中 DON 的卫生限量标准正在制定中,而国内开展的对 DON 的检测,主要是薄层色谱法(TLC),该法操作复杂,费时,检测灵敏度低且不能准确定量。所以,本文报道的 ELISA 方法,配合标准的实施,有利于在食品卫生领域内开展对

DON 的监测,以保障广大消费者的食用安全和身体健康。

参 考 文 献

- [1] 孟昭赫主编. 食品卫生检验方法注解——微生物学部分. 北京: 人民卫生出版社, 1990.
- [2] Toshitsugu T *et al.* *Food Additives and Contaminants*, 1985, **2**(2):125.
- [3] Trenholm H L *et al.* *J Am Oil Chem Soc*, 1981, **58**:992A.
- [4] 时传和, 等. 卫生研究, 1992, **21**(5):256.
- [5] Zhang G S *et al.* *J Food Prot*, 1986, **49**(5):336.
- [6] Xu Y C *et al.* *J Assoc Off Anal Chem*, 1988, **71**(5):945.
- [7] Xu Y C *et al.* *ibid*, 1986, **69**(6):967.
- [8] Casale W L *et al.* *J Agric Food Chem*, 1988, **36**:663.
- [9] 时传和, 等. 环境科学学报, 1992, **12**(3):124.
- [10] Yang C H *et al.* *Chinese Science Bulletin*, 1991, **36**:1829.
- [11] Scott P M *J Assoc Off Anal Chem*, 1982, **65**:876.
- [12] Pohland A *et al.* Ed. Kurata H, Ueno Y. *Toxigenic Fungi Their Toxin and Health Hazard*. Amsterdam: Elsevier Scientific Publishers, 1984, 217.
- [13] Truelsen M W *et al.* *J Assoc Off Anal Chem*, 1984, **67**:40.

DETERMINATION AND STUDY OF DEOXYNIVALENOL (DON) IN WHEAT USING INDIRECT COMPETITIVE ENZYME-LINKED IMMUNOSORBENT ASSAY BASED ON MONOCLONAL ANTIBODY

Yang Chuanhe Liu Chang Luo Xueyun Ji Rong

Ran Lu Chang Di Chang Jing

(Institute of Food Safety Control and Inspection,

Ministry of Public Health, Beijing 100021)

Abstract A hybridoma cell line secreting monoclonal antibody against deoxynivalenol (DON) was established by fusion of spleen cells with myeloma. The antibody was designated 3D7 with the subtype IgG₁. Meanwhile, indirect competitive enzyme-linked immunosorbent assay for determination of DON in wheat was developed with this antibody. The linear range for detection of DON was 5—1 000 ng/ml and the minimum detected concentration was 5 ng/ml. The mean recovery rates and CV% from sample spiked with 5—1 000 ng/ml of DON were 96.6—107.3% and 5.1—14.2%, respectively. Analysis of 10 samples for DON showed positive results, and the concentration ranged from 56.4—1002.0 ppb.

Key words Monoclonal antibody, Deoxynivalenol, Wheat