

饲料中 T-2 毒素直接竞争 ELISA 检测方法的建立

冯才伟¹, 郝士元¹, 孙满义², 马腊腊¹, 刘琳¹, 王建霞¹

(1. 北京勤邦生物技术有限公司, 北京 102206; 2. 安佑(中国)动物营养研发有限公司, 江苏 太仓 215437)

摘要: 采用直接竞争 ELISA 方法建立了一种快速检测饲料样本中 T-2 毒素残留的方法, 在 0~81 $\mu\text{g/L}$ 范围内, T-2 毒素的 $\text{Logit}(B/B_0)$ 与 T-2 毒素质量浓度的对数呈显著的线性关系, 并对该检测体系的检测限、准确度、精密度等性能进行了测定。结果显示, 该方法的 IC_{50} (半数抑制质量浓度) 为 2.8 $\mu\text{g/L}$, 对饲料样本的检测限为 10 $\mu\text{g/kg}$, 样本添加回收率为 77.6%~98.2%, 变异系数为 5.1%~12.0%。该方法操作简便、准确, 检测时间短(仅需 15 min), 适用于饲料样本中 T-2 毒素的快速检测。

关键词: 直接竞争酶联免疫法; T-2 毒素; 饲料; 检测

中图分类号: S816.17 文献标志码: A 文章编号: 1004-3268(2013)01-0110-04

Establishment of Direct Competitive ELISA for Detecting T-2 Toxin in Animal Feeds

FENG Cai-wei¹, HAO Shi-yuan¹, SUN Man-yi², MA La-la¹, LIU Lin¹, WANG Jian-xia¹

(1. Beijing Kwinbon Biotechnology Co., Ltd., Beijing 102206, China;

2. Anyou (China) Research of Animal Nutrition Co., Ltd., Taicang 215437, China)

Abstract: For detecting the content of T-2 toxin in animal feeds, a direct competitive enzyme-linked immunosorbent assay (ELISA) was established in this study. The results showed that in the concentrate range of 0-81 $\mu\text{g/L}$, $\text{Logit}(B/B_0)$ of T-2 toxin showed a significant liner relationship with the logarithm value of T-2 toxin. The IC_{50} of the established method was 2.8 $\mu\text{g/L}$ and the detection limit of feed was 10 $\mu\text{g/kg}$. The sample recoveries and the coefficients of variation were 77.6%-98.2% and 5.1%-12.0%, respectively. The data indicates that this ELISA kit is convenient, accurate, and can be used for the rapid screening analysis of T-2 toxin in animal feeds.

Key words: direct competitive ELISA; T-2 toxin; feed; detection

T-2 毒素(T-2 toxin)是镰刀菌所产生的单端孢霉烯族毒素中毒性最强的一种, 是能导致动物产生中毒反应的次级代谢物质, 饲料中 T-2 毒素含量无论高或低, 均会导致动物采食量下降、质量增加缓慢、免疫系统损伤等^[1]。T-2 毒素等单端孢霉烯族毒素毒性强、污染范围广, 动物采食被毒素污染的谷类及其产品会导致饲料中毒。因此, 对饲料中

的单端孢霉烯族毒素进行定性和定量检测十分重要^[2]。T-2 毒素对人和动物表现出基因毒性、免疫毒性、血液毒性等多种毒性, 并可致多种细胞凋亡^[3]。由于其毒性剧烈, 国际上非常重视 T-2 毒素对人畜的危害, 1987 年联合国粮农组织(FAO)和世界卫生组织(WHO)就提出, 面粉、大米等禾谷类作物中 T-2 毒素含量不得超过 100 $\mu\text{g/kg}$ ^[4]。

收稿日期: 2012-09-04

作者简介: 冯才伟(1978-), 男, 贵州开阳人, 兽医师, 本科, 主要从事食品安全快速检测技术研究。

E-mail: xiangmubu@kwinbon.com

T-2毒素的检测方法主要有薄层色谱法、气相色谱法、高效液相色谱法、液相色谱-质谱法、放射性免疫检测法、酶联免疫法等^[1-14]。气相色谱和液相色谱法需要对T-2毒素进行衍生化处理;液相色谱-质谱联用灵敏度较高,不需要进行衍生化处理,是检测T-2毒素比较理想的方法。用稳定同位素稀释法辅助检测单端孢霉烯族毒素在未来将会进一步提高LC-MS/MS的检测效果,特别是对于混合饲料^[2]。放射免疫法、酶联免疫法及免疫荧光法等免疫学检测因其灵敏、快速、简单而被用于T-2毒素的测定。酶联免疫法(ELISA)以其灵敏度高、特异性好、操作简便、成本低等优点于1992年被我国定为检测标准^[12],直接竞争ELISA只需一种结合有标记物的抗体,适合于大量样品的快速筛选。本研究建立和优化了酶联免疫检测方法,开发了能够快速筛选T-2毒素的酶联免疫试剂盒,以期能够快速检测饲料样本中T-2毒素提供技术支持。

1 材料和方法

1.1 材料

1.1.1 主要仪器 8010S匀浆机,上海斯伯明仪器设备有限公司;KS-II振荡器,上海跃进医疗器械厂;Anke TDL-40B低速离心机,上海安亭科学仪器有限公司;2000SBL电子天平,美国Setra公司;MK3酶标仪,美国Thermo公司;微量移液器(单道20~200 μL 、100~1 000 μL ,多道250 μL),美国Thermo公司。

1.1.2 主要试剂 T-2毒素单克隆抗体,自制;T-2毒素标准品购自Sigma公司;甲醇、氯化钠购自国药集团化学试剂有限公司,均为分析纯;试验用水为去离子水。

1.2 方法

1.2.1 抗原最佳包被质量浓度及酶标记单克隆抗体工作液最佳工作浓度的确定 采用方阵滴定法进行测定,具体方法如下:用pH值为9.6的0.2 mol/L的碳酸盐缓冲液将包被抗原分别稀释为2.0、1.0、0.5、0.2、0.1、0.05 $\mu\text{g/mL}$,100 μL /孔包被酶标板,37 $^{\circ}\text{C}$ 温育2 h,洗涤后用封闭液37 $^{\circ}\text{C}$ 封闭2 h。洗涤后加入稀释倍数分别为5 000、10 000、50 000、100 000倍的酶标记单克隆抗体工作液100 μL /孔,25 $^{\circ}\text{C}$ 温育10~20 min,洗涤后显色,终止反应测定 $\text{OD}_{450\text{ nm}}$ 值。选择 $\text{OD}_{450\text{ nm}}$ 值最接近2.0的孔所对应的抗原包被质量浓度和酶标记抗体工作液浓度作为抗原抗体的最佳工作浓度。

1.2.2 反应时间的确定 以筛选的包被抗原最佳

工作质量浓度包被,加入标准品0 $\mu\text{g/L}$,加入最佳工作浓度的酶标记抗体工作液,分别在25 $^{\circ}\text{C}$ 反应5、10、15、20 min,整板测定零标准品 $\text{OD}_{450\text{ nm}}$ 值,每板做6个对照孔,以“零标准 $\text{OD}_{450\text{ nm}}$ 值为1.5~2.0,变异相对较小且节省时间”为判定标准,选择最佳反应时间。

1.2.3 底物液显色时间的确定 加底物显色液后分别显色5、10、15 min,用2 mol/L的硫酸溶液终止反应,测定0 $\mu\text{g/L}$ 和1 $\mu\text{g/L}$ 标准品 $\text{OD}_{450\text{ nm}}$ 值,选择最适底物显色时间。

1.2.4 ELISA标准曲线的调试 将上述筛选所得的最佳质量浓度的抗原包被在96孔酶标板上,100 μL /孔,置37 $^{\circ}\text{C}$ 条件下恒温避光反应2 h;倾去板中溶液,洗涤3次,加入封闭液,200 μL /孔,37 $^{\circ}\text{C}$ 温育2 h;加入系列浓度的T-2毒素标准溶液,20 μL /孔,再加入最佳工作浓度的酶标记抗体工作液,100 μL /孔,以最佳反应时间、最适底物液显色时间为反应条件进行直接竞争ELISA反应调试标准曲线。在优化调试中为了利于保存和节约稀释液,根据实际需要将酶标记抗体工作液以浓缩液的形式保存,在使用时根据需要量将浓缩酶标记抗体用稀释液按照1:10的体积进行稀释后得到酶标记抗体工作液进行试验。

1.2.5 饲料样本前处理方法的建立 称取(5.0 \pm 0.05)g均质器均质的饲料样本至50 mL聚苯乙烯离心管中,加入25 mL 50%的甲醇,用振荡器剧烈振荡5 min,3 000 g以上,室温(20~25 $^{\circ}\text{C}$)离心5 min;取500 mL上清液至2 mL聚苯乙烯离心管中,加入500 mL 10%的氯化钠水溶液,用振荡器振荡1 min,混匀;取20 mL用于分析。

1.2.6 试剂盒检测限的测定 测定20份空白原料、配合料、浓缩料样本,以测定20份样本的质量浓度平均值(\bar{X})加3倍标准差(S)作为T-2毒素在该样本中的检测限(MDL),即 $\text{MDL}=\bar{X}+3S$ 。

1.2.7 精密度和准确度的测定 取空白原料、配合料、浓缩料均质物,分别添加T-2毒素至一定质量浓度,每个质量浓度做6个平行,取3个批次的试剂盒测定T-2毒素的残留量,计算添加回收率和变异系数,用批内差异和批间差异表示该方法检测的精密度。

1.2.8 试剂盒保存期试验 将足量试剂盒在4 $^{\circ}\text{C}$ 条件下避光恒温保存,每隔一定时间分别取出,利用直接竞争ELISA法测定;同时考虑在运输和使用过程中,会有非正常保存条件出现,将试剂盒在37 $^{\circ}\text{C}$ 保存条件下进行加速老化试验,比较各标准曲线的线性、抑制率和 IC_{50} (半数抑制质量浓度)的差异。

一般来讲,在 37 ℃ 每稳定 1 d,可相当于 4~10 ℃ 保存一个半月^[15]。

2 结果与分析

2.1 抗原最佳包被质量浓度和酶标记抗体工作液最佳工作浓度的确定

经过筛选试验,得到抗原包被最佳质量浓度为 0.2 μg/mL,酶标记抗体工作液最佳质量浓度为 1:50 000。

2.2 反应时间的确定

通过试验筛选发现,反应时间越长,吸光度值越高,反应 10 min 时,板孔的 OD_{450 nm} 值接近 2.0 且变异较小,随着反应时间的延长,OD_{450 nm} 值多在 2.3 以上且变异有所增大,综合考虑,标准品 OD_{450 nm} 值接近 2.0,板孔变异相对较小且节省时间,反应 10 min 时结果较为理想。故选择 25 ℃ 反应 10 min 作为最佳反应时间。

2.3 底物液显色时间的确定

通过测定不同显色时间的标准品 OD_{450 nm} 值,显色 5 min 时 0 μg/L 的 OD_{450 nm} 值为 1.936,1 μg/L 的 OD_{450 nm} 值为 1.510,随着显色时间的延长,吸光度值越高,显色颜色越深,故选择显色 5 min 作为理想的反应时间,更节省检测时间。

2.4 ELISA 标准曲线的建立

按照筛选的最佳条件建立 ELISA 标准曲线,选择 T-2 毒素标准品质量浓度 0、1、3、9、27、81 μg/L,以百分吸光度值 (B/B_0) 为纵坐标 (Y),标准品质量浓度的对数值为横坐标 (X) 绘制标准曲线如图 1。以 $\text{Logit}(B/B_0)$ 为纵坐标, T-2 毒素标准品质量浓度的对数值 ($\lg C$) 为横坐标,将图 1 转换后可知,标准曲线 IC_{50} 为 2.8 μg/L,在 0~81 μg/L 范围内, $\text{Logit}(B/B_0)$ 与 T-2 毒素质量浓度的对数 ($\lg C$) 呈显著的线性关系(图 2),回归方程为 $Y = -1.728X + 0.960$,相关系数 $R^2 = 0.983$ 。

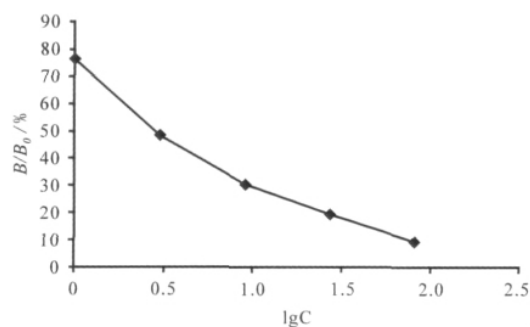


图 1 T-2 毒素标准曲线

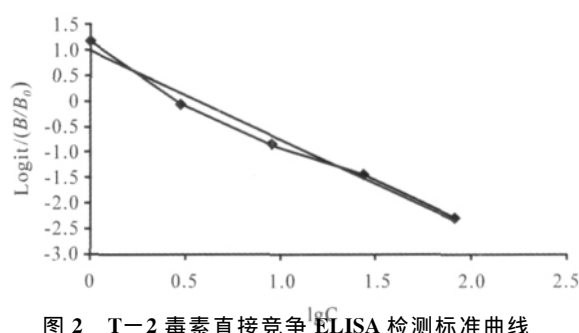


图 2 T-2 毒素直接竞争 ELISA 检测标准曲线

2.5 ELISA 试剂盒检测限的确定

同时测定 20 份空白原料、配合料和浓缩料样本的吸光度值,从标准曲线上查出对应于吸光度的各浓度,计算试剂盒的检测限。试剂盒检测饲料样本中 T-2 毒素检测限可达到 10 μg/kg(表 1)。

表 1 ELISA 试剂盒检测限的测定结果 ($n=20$)

样本	平均值/(μg/kg)	标准差	检测限/(μg/kg)
原料	3.16	2.20	9.76
配合料	3.26	2.22	9.92
浓缩料	2.98	1.93	8.77

2.6 ELISA 试剂盒检测的精密度和准确度

ELISA 试剂盒测定的精密度以变异系数表示,准确度以回收率表示。取空白原料、配合料、浓缩料均质物,分别添加 T-2 毒素标准品至质量浓度为 20、40 μg/kg。计算平均回收率和变异系数,检测结果见表 2。由表 2 可知,以 20、40 μg/kg 的 T-2 毒素对空白原料、配合料、浓缩料进行添加,其添加回收率为 77.6%~98.2%,批内变异系数为 5.1%~10.3%,批间变异系数为 10.0%~12.0%,数据结果显示试剂盒重复性较好。

表 2 ELISA 试剂盒的精密度和准确度

样本	质量浓度/(μg/kg)	批次	平均回收率/%	批内 CV/%	批间 CV/%
原料	20	第 1 批	92.6	8.5	10.0
		第 2 批	96.8	7.4	
		第 3 批	83.4	8.1	
	40	第 1 批	82.3	9.7	12.0
		第 2 批	96.2	6.0	
		第 3 批	79.7	10.3	
配合料	20	第 1 批	79.1	7.1	10.5
		第 2 批	96.3	5.9	
		第 3 批	92.8	6.5	
	40	第 1 批	89.0	8.1	11.7
		第 2 批	77.6	5.5	
		第 3 批	98.2	6.0	
浓缩料	20	第 1 批	90.8	5.1	10.1
		第 2 批	79.5	7.0	
		第 3 批	96.5	6.5	
	40	第 1 批	78.1	6.5	10.5
		第 2 批	87.2	5.8	
		第 3 批	96.3	6.1	

2.7 试剂盒保存期

将试剂盒在 4℃ 下避光恒温保存,前 12 个月试剂盒的标准品吸光度值和 IC_{50} 均在正常范围内,标准曲线的线性良好。试剂盒在 37℃ 条件下保存,经过 13 d 测试,标准品 IC_{50} 和吸光度值正常,线性良好,待延长保存到 30 d 后 IC_{50} 有升高的趋势。试剂盒可以在 2~8℃ 保存 12 个月以上。

3 结论与讨论

本研究采用酶标记单克隆抗体的直接竞争 ELISA 建立了饲料中 T-2 毒素残留的酶联免疫检测方法,在研究中采用方阵法对包被抗原和抗体的最佳工作浓度进行确定,并筛选了最佳反应条件,建立和完善了 ELISA 方法,该方法的 IC_{50} 为 2.8 $\mu\text{g}/\text{L}$,饲料样本中最低检测限为 10 $\mu\text{g}/\text{kg}$,样本添加回收率范围为 77.6%~98.2%,批内批间变异系数均小于 20%,这些数据表明,本试验建立的 T-2 毒素酶联免疫方法的灵敏度、准确度、精密度较高,能满足残留检测要求,并且检测时间短(仅需 15 min),样本前处理简单、仪器设备投资少,检测成本低,适合于进行饲料样本中 T-2 毒素残留的快速检测。

参考文献:

- [1] 刘胜利,何成华,王莹,等. 饲料中 T-2 毒素的高效液相色谱-荧光法检测研究[J]. 畜牧与兽医,2011,43(11):25-29.
- [2] 吴文达,何成华,王希春,等. 饲料中单端孢霉烯族真菌毒素检测方法的探讨[J]. 安徽农业科学,2009,37(36):18002-18004.
- [3] 陈静宏,杨占田. T-2 毒素及其与大骨节病关系的研究进展[J]. 中国地方病防治杂志,2004,19(4):213-217.
- [4] 牟仁祥,曹赵云,金连登,等. 免疫亲和柱净化-液相色谱质谱法对粮谷中 T-2 与 HT-2 毒素的测定[J]. 分析测试学报,2009,28(3):368-371.
- [5] 李军,许烨,隋凯,等. 免疫亲和柱净化/柱前衍生化-高效液相色谱荧光检测法测定粮谷中的 T-2 毒素[J]. 色谱,2006,24(3):256-259.
- [6] 王晓春,汤奇峰,李鹏飞. 高效液相色谱-三重四级杆串联质谱测定谷物中 T-2 毒素和 HT-2 毒素[J]. 分析实验室,2011,30(9):62-65.
- [7] 马丽景,许书免,饶正华,等. 高效液相色谱紫外法测定饲料中的 T-2 毒素[J]. 饲料研究,2006(4):60-62.
- [8] 杨润琳,计融,江涛,等. T-2 毒素的高灵敏时间分辨荧光免疫分析[J]. 食品与机械,2010,26(1):74-76,85.
- [9] 江涛,郑佳,李楠,等. 抗 T-2 毒素单抗独特型抗体的制备及应用研究[J]. 中国食品卫生杂志,2007,19(3):234-237.
- [10] 江涛,王环宇,高秀芬,等. 抗 T-2 毒素单克隆抗体的制备及特性[J]. 军事医学科学院院刊,2004,28(4):311-318.
- [11] 徐娟. T-2 毒素多克隆抗体的制备及其化学发光免疫检测的初步研究[D]. 武汉:华中农业大学,2010.
- [12] 张薇. 抗 T-2 毒素单链抗体的制备及该毒素对细胞毒性影响的初步研究[D]. 福州:福建农林大学,2010.
- [13] 徐娟,洪淑娟,付建英,等. T-2 毒素人工抗原的制备[J]. 化学与生物工程,2010,27(9):66-68.
- [14] 曹艳红,孟宪清,冯杰,等. 检测 T-2 毒素的直接竞争性酶联免疫吸附测定法的研究[J]. 中国人兽共患病杂志,2006,22(2):132-135.
- [15] 唐伟国. 医学检验诊断试剂的制备与应用[M]. 上海:上海科学技术文献出版社,1996.