

酶联免疫法快速检测牛奶及其制品中的黄曲霉毒素 B₁ * Application of ELISA for Rapid Detection Aflatoxin B₁ in Milk and Dairy Products

卢安根, 莫建光, 杜寒春, 陈秋虹

LU An-gen, MO Jian-guang, DU Han-chun, CHEN Qiu-hong

(广西分析测试研究中心, 广西南宁 530022)

(Guangxi Research Center of Analysis and Testing, Nanning, Guangxi, 530022, China)

摘要:为了建立乳及乳制品中黄曲霉毒素 B₁ 的快速检测方法,对酶联免疫吸附法(ELISA)快速检测牛奶及其制品中的黄曲霉毒素 B₁ 进行灵敏度、准确度、精密度、重复性、重现性等方法学评价试验,并用高效液相色谱法进行验证。结果 ELISA 的灵敏度为 0.03ng/ml,加标回收率为 95.0%~104.2%,精密度相对平均偏差与相对标准偏差均为 1.0%~1.6%,重复性的相对标准偏差为 3.15%,再现性的相对标准偏差为 8.21%。样品测定结果 ELISA 与液相色谱法的相对标准偏差小于 10%。ELISA 可以较快速地、准确地、大批量地检测牛奶及其制品中的黄曲霉毒素 B₁。

关键词:酶联免疫吸附法 黄曲霉毒素 B₁ 快速检测 乳 乳制品

中图分类号:Q5-33 **文献标识码:**A **文章编号:**1002-7378(2010)03-0306-03

Abstract: A enzyme-linked immunosorbent assay (ELISA) was established to rapidly detect aflatoxin B₁ in milk and dairy products. The sensitivity, accuracy, precision, repetitiveness and reproduction of were aflatoxin B₁ detection in milk and dairy products by ELISA methodological. High performance liquid chromatography was used to verify the aflatoxin B₁ by evaluated ELISA. The sensitivity was 0.03ng/ml. The recovery of standard addition was 95.0% to 104.2%. The relative average deviation and relative standard deviation of precision (RSD) was both in the range of 1.0% to 1.6%. The RSD of repetitiveness and reproduction was 3.15% and 8.21% respectively. The RSD on validation of method between HPLC and ELISA was less than 10%. The residue of aflatoxin B₁ in milk and dairy products can be rapidly and accurately detected on a mass scale with ELISA method.

Key words: ELISA, aflatoxin B₁, rapid detection, milk, dairy products

黄曲霉毒素 B₁ (AFB₁) 是在黄曲霉毒素中毒性最强的天然物质,是由黄曲霉和寄生曲霉等产生的一类化合物^[1]。黄曲霉毒素 B₁ 具有诱导突变、抑制免疫和致癌的作用。黄曲霉毒素存在于土壤,谷物及其制品、乳及乳制品中。奶牛在食入被黄曲霉毒素 B₁ 污染的饲料后,经身体代谢作用后,能够转变为黄曲霉毒素 M,也能以黄曲霉毒素 B₁ 的形式残留在动物体内,这些物质分布于乳汁、尿液以及内脏器官

中^[2,3]。人类若食用这些含黄曲霉毒素的肉类、内脏、乳汁及其制品,健康将会受到损害。牛奶营养丰富,容易变质与滋生霉菌,从而容易污染生物毒素。因此,能够及时、快速、准确的检测出牛奶中黄曲霉毒素 B₁ 具有十分重要的意义^[4,5]。

目前,黄曲霉毒素 B₁ 的定量检测方法主要有高效液相色谱法、薄层层析法及免疫分析法等。高效液相色谱法具有灵敏度高、准确、自动化等优点,但是因为仪器价格昂贵,难以在基层推广。薄层层析法主要不足是灵敏度不高,特异性不强,仅能半定量,测定时间较长,不适合于大批量样品的快速检测,而且操作人员要直接接触毒素和大量有潜在危害的有机溶剂。酶联免疫吸附法(ELISA)利用抗原和抗体的

收稿日期:2010-06-26

作者简介:卢安根(1974-),男,高级工程师,主要从事保健食品和生物产品分析测试研究工作。

* 广西科技基础条件平台建设项目(08-05-01D)资助。

免疫反应和酶的高效催化作用进行定性定量测定,其特异性强,灵敏度高,分析速度快,而且不需昂贵的仪器设备,前处理简单,易于在基层推广,在生物毒素的检测中已得到广泛应用,是一项实用新技术。黄曲霉毒素 B₁ 的酶联免疫吸附检测法,目前在原粮及其制品、饲料等产品上已有相关技术标准,但是在牛奶等动物性食品中的检测应用尚未见有报道。本文探讨利用酶联免疫吸附法建立牛奶中黄曲霉毒素 B₁ 的检测技术,为牛乳及其制品中黄曲霉毒素 B₁ 的快速检测提供一定的技术支持。

1 实验部分

1.1 主要仪器设备

Spectra MR 全波长酶标仪(美国 DYNEX 公司产品),高效液相色谱 2695 系统(美国 Waters 公司产品),JJ500 型电子天平(江苏常熟市双杰测试仪器厂生产),日立 CR22G 高速冷冻离心机,LRH-150B 型生化培养箱(广东医疗器械厂生产),微量移液器(德国 Eppendorf 公司产品)。

1.2 试剂与材料

黄曲霉毒素标准品是德国 Sigma-Aldrich 化学有限公司产品,3 μ g/ml;实验用水为蒸馏水。黄曲霉毒素 B₁ 试剂盒是江苏省苏微微生物研究有限公司产品(批号:2010118,2010512),试剂盒包含:包被抗体的微孔,反应板框架,样品稀释液,黄曲霉毒素 B₁ 标准溶液,酶标抗原,酶标抗原稀释液,浓缩洗涤液,显色底物 a,显色底物 b,终止液。

主要材料有:纯牛奶、酸牛奶,和奶粉。牛奶有不同品牌,不同批号,部分样品过期。

1.3 实验方法

1.3.1 标准曲线的绘制

将试剂盒平衡到室温。微孔板编号,1号孔为空白。2~7号孔为 AFB₁ 标准。洗涤,每孔加入 250 μ l 左右洗涤液,洗涤液不得溢出,放置 1min 后,甩掉洗涤液,在吸水纸上拍干,重复洗板 1 次。免疫反应:分别移取 50 μ l 系列标准溶液 0 ng/ml,0.1 ng/ml,0.25 ng/ml,0.50 ng/ml,1.0 ng/ml,2.0 ng/ml 加入 2~7 号孔中,再分别加入 50 μ l 酶标抗原;1 号孔加 50 μ l 样品稀释液和 50 μ l 酶标抗原稀释液,然后在将微孔板放入 37 $^{\circ}$ C 恒温培养箱中孵育 30min。再洗涤:取出微孔板,用力甩掉反应液,拍干,然后每孔加入 250 μ l 左右洗涤液,放置 2min 后,甩掉洗涤液,在吸水纸上拍干,重复洗板 4 次。显色:每孔分别加入显色底物 a 和显色底物 b 各 50 μ l,摇匀,将反应板放

入 37 $^{\circ}$ C 恒温箱中显色 15min。终止与仪器测定:每孔分别放入终止液 50 μ l,摇匀后用酶标仪在 450nm 波长处测定各孔的吸光度。

1.3.2 方法学考察

进行灵敏度、准确度、精密性、重复性、重现性方法学评价实验。

1.3.3 样品前处理和定量计算

样品前处理参照文献[6]。样品定量计算是将系列黄曲霉毒素 B₁ 标准溶液测得的吸光度 A 值绘制成标准曲线,横坐标为标准液浓度的对数,纵坐标为各标准液孔 A 值与 0ng/ml 标准液孔的 A 值的比值;计算待测样品孔 A 值与 0ng/ml 标准液孔 A 值的比值,查标准曲线可得相应待测样液浓度的对数值,对其求反对数,即求得待测溶液的黄曲霉毒素 B₁ 浓度。

2 结果与分析

2.1 标准曲线的建立

免疫终止反应后,在 450nm 波长下读取吸光度 A 值。再以抑制率为纵坐标,标准溶液浓度的对数为横坐标,绘制标准曲线,回归方程为 $Y = -0.1311 \ln(x) + 0.405$,相关系数 $r^2 = 0.9981$,说明黄曲霉毒素 B₁ 在 0~2ng/ml 浓度范围内线性关系良好。

2.2 方法学考察

2.2.1 灵敏度试验

以零浓度标准重复测定 6 次,均扣除空白后,计算平均吸光度为 0.840,标准差 s 为 0.78%, $\bar{x} + 2s$ 在标准曲线上对应的浓度即为灵敏度^[7]。经计算得灵敏度为 0.03ng/ml。

2.2.2 加标回收试验

取浓度为 3 μ g/ml 标准溶液 1ml 溶于 49ml 甲醇稀释成 60ng/ml 的黄曲霉毒素 B₁ 标准工作液,分别移取 1ml、0.50ml、0.25ml、0.05ml 到预先装有 14g 牛奶的小杯中,补加牛奶到 15g,混合均匀。每个实验做 3 个平行,读取免疫反应后各个样品的吸光度,计算回收率,结果(表 1)加标回收率为 95.0%~104.2%。

2.2.3 重复性实验

在同一实验室中,同一操作人员连续 2 天对加标浓度为 0.5 μ g/kg 的牛奶按样品测定程序检测黄曲霉毒素 B₁,第 1 天的吸光度为 0.470~0.481,第 2 天的吸光度为 0.493~0.508,2 天检测结果的相对标准偏差为 3.15%,说明实验的重复性良好。

表1 加标回收试验结果

加入 AFB ₁ 浓度 ($\mu\text{g}/\text{kg}$)	检出的 AFB ₁ 含量($\mu\text{g}/\text{kg}$)			平均回收率 (%)
	1	2	3	
4.0	3.98	4.04	3.91	99.4
2.0	1.97	2.09	2.13	104.2
1.0	0.943	1.00	0.928	95.7
0.20	0.202	0.178	0.190	95.0

2.2.4 复现性实验

在2个不同的实验室,2个检验操作人员对加标浓度为 $0.5\mu\text{g}/\text{kg}$ 的牛奶按样品测定程序检测黄曲霉毒素 B_1 ,实验室1的平均吸光度为0.461,实验室2的平均吸光度为0.531,2个实验室结果的相对标准偏差8.21%,说明实验的复现性良好。

2.2.5 精密度试验

取加标浓度为 $2.0\mu\text{g}/\text{kg}$ 、 $1.0\mu\text{g}/\text{kg}$ 、 $0.2\mu\text{g}/\text{kg}$ 的牛奶,按样品测定程序检测黄曲霉毒素 B_1 ,平行测试6次,分别计算出这3个浓度的相对平均偏差依次为1.1%、1.3%、1.0%,相对标准偏差依次为1.4%、1.6%、1.3%。

2.2.6 检测方法验证

在市面上购买7个待测样品:3个纯牛奶,2个酸牛奶,2个奶粉,部分为过期产品。以样品测定程序检测黄曲霉毒素 B_1 。由于酸牛奶在加工过程中使用脱脂牛奶,故处理酸牛奶时可以免去脱脂步骤。同时用高效液相色谱法(GB/T 5009.23-2003)检测同一样品作为比对。检验结果(表2)显示,酶联免疫吸附法与高效液相色谱法的相对标准偏差小于10%,酶联免疫吸附法应用于多种类型牛奶制品的检验结果与高效液相色谱法的结果比较靠近,说明酶联免疫吸附法是有用的、可行的。

表2 样品检验及方法比对结果

样品	ELISA 法 ($\mu\text{g}/\text{kg}$)	HPLC 法 ($\mu\text{g}/\text{kg}$) [*]	相对标准 偏差(%)
纯牛奶1	未检出	<0.3	—
纯牛奶2	1.14	1.03	7.2
纯牛奶3	0.42	0.48	9.4
酸牛奶1	0.91	0.82	7.4
酸牛奶2	0.60	0.68	8.8
奶粉1	未检出	<0.3	—
奶粉2	未检出	<0.3	—

*: HPLC 检测黄曲霉毒素 B_1 的最低检出限为 $0.3\mu\text{g}/\text{kg}$ 。

3 结束语

本研究结果表明酶联免疫吸附法在技术上可以

达到牛奶及其制品中黄曲霉毒素 B_1 检验的要求,具有高灵敏度、高准确度、高精密度、安全性好、快速的特点。但是,酶联免疫吸附法受到多种因素因素影响,检测结果有时波动很大,检测时应注意细节操作:每次实验洗涤要干净、操作要迅速;试剂使用前要摇匀;加样要准确,直接加到小孔底部,不可有气泡,不要加到孔壁上;反应时间一致;加样后使反应液尽快混匀;不同批次试剂盒的试剂不能混用。另外,酶联免疫法所消耗的时间较短,一般测试一批样品(96孔板)从样品的前处理到测试结束最多需要3h左右,而且一次性可以检测多个样品,可以实现批量测定,大大节省了时间与试剂的消耗。酶联免疫吸附法的建立对于及时快速并准确的检测牛奶中黄曲霉毒素 B_1 有着重要的意义,为牛奶产品的质量安全生产以及质量监控提供了技术支持。

致谢:

广西大学行健文理学院黄飞同学参与了部分工作,作者特此致谢。

参考文献:

- [1] 王雄,董颖超,果旗,等. 饲料中黄曲霉毒素 B_1 快速检测试剂盒的研制与应用[J]. 中国农业科技导报,2008,10(S2):101-105.
- [2] Singh P, Jang L. Membrane-based enzyme immunoassay test for aflatoxin B_1 [J]. Food Microbiol, 1987,5(1):73-80.
- [3] Cole R J, Dorner J W. Extraction of aflatoxin from naturally contaminated peanuts and solvent peanut rations[J]. J AOAC Int, 1994,77(6):1509-1511.
- [4] 姚正堂. 酶联免疫吸附法快速测定黄曲霉毒素 B_1 [J]. 预防医学情报杂志,2003,19(5):468-469.
- [5] 商博东,王翔冬,张维,等. 酶联免疫吸附法在食品安全分析中的应用[J]. 中国卫生检验杂志,2005,15(11):1406-1408.
- [6] 浙江省质量技术监督局. DB33/T 556-2005 乳和乳粉中黄曲霉毒素 M_1 的测定:酶联免疫吸附法[S]. 2005.
- [7] 曾昭伟,王学谦,李会强,等. 促红细胞生成素 ELISA 试剂盒的建立及其方法学研究[J]. 中国医学检验杂志,2009,10(3):113-115.

(责任编辑:邓大玉)