

陈斌,曾昆,吴琴燕,等. 基于多酶辅助信号放大的脱氧雪腐镰刀菌烯醇高灵敏免疫检测方法的建立[J]. 江苏农业科学,2022,50(17):211-217.
doi:10.15889/j.issn.1002-1302.2022.17.034

基于多酶辅助信号放大的脱氧雪腐镰刀菌烯醇高灵敏免疫检测方法的建立

陈斌¹, 曾昆¹, 吴琴燕², 杨健¹, 顾鑫凯¹

(1. 江苏大学环境与安全工程学院, 江苏镇江 212013; 2. 江苏丘陵地区镇江农业科学研究所, 江苏镇江 212013)

摘要:脱氧雪腐镰刀菌烯醇(deoxynivalenol, DON)是粮食作物中常见的污染毒素之一,建立相应的快速筛选方法尤为必要。基于抗原-抗体特异性反应,建立 DON 间接竞争 ELISA 方法。优化反应条件(抗原和抗体浓度、离子强度、pH 值、有机溶剂),该方法检测限可达 3.12 ng/mL。为进一步提高检测灵敏度,以碳纳米管为载体,荷载酶标记二抗分子,构建通用型的多酶信号颗粒。建立多酶辅助信号放大的 DON 免疫分析方法,优化多酶颗粒浓度后,检测限可达 0.63 ng/mL,比间接竞争 ELISA 方法灵敏度提高 5 倍。对大米、小麦和玉米进行加标试验,添加回收率在 87.65%~114.50% 间;在本地购买的谷物样本中 DON 最高检出浓度为 147.64 ng/g,检出率为 53.33%,该方法操作简单、快速、灵敏度高,可为谷物中真菌毒素污染提供有力的检测与监测手段。

关键词:真菌毒素;脱氧雪腐镰刀菌烯醇;多酶信号颗粒;碳纳米管;信号放大

中图分类号:TS207.4 **文献标志码:**A **文章编号:**1002-1302(2022)17-0211-06

真菌毒素是真菌产生的次级代谢产物,极易在作物生长、收获及粮食储藏过程中产生^[1]。在我国,由于人们的传统饮食规律,谷物食用比例远高过西方国家,使得真菌毒素危害十分明显^[2]。其中,脱氧雪腐镰刀菌烯醇(deoxynivalenol, DON)是从被禾谷镰刀菌污染的玉米中分离出的一种真菌毒素,并且是粮食作物中常见的污染毒素之一,因其能够引起呕吐,故又称呕吐毒素^[3~4]。DON 能够直接污染农作物,然后通过农作物进入到人或动物体内,能够诱发呕吐,导致动物出现厌食、胃肠炎、腹泻、生长缓慢,甚至还会产生免疫抑制或血液病等^[5~6]。有研究表明,90% 感染真菌毒素的样本里均含有 DON^[7]。我国规定谷物及其制品中 DON 的限量标准为 1 mg/kg^[8],联合国食品添加剂专家委员会规定人体对 DON 及其衍生物每日最大耐受摄入量为 1 μg/kg^[9]。郭红卫等在对我国河南地区及上海市赤霉病流行年份与非流行年份小麦中镰刀

菌污染情况进行调查时,发现 DON 含量的中位数分别为 933.0、14.2 mg/kg^[10],远高于我国规定的限量标准。常规真菌毒素检测以仪器分析方法为主,包括高效液相色谱法^[11~12]、液质联用^[13~14]等技术,尽管灵敏度高、准确性好,但这些仪器分析均需要专业技术人员操作,且仪器设备成本高,前处理过程复杂,不能满足大规模样本快速分析需求。免疫分析方法具有灵敏度高、特异性好等优点,适用于大量样本的现场筛查,已广泛应用于食品安全、环境监测、临床诊断等领域^[15~16]。

免疫分析方法是基于抗原-抗体的特异性结合,结合酶、荧光物质^[17]、纳米颗粒^[18]等报告分子,输出检测信号。凭借高效催化作用、专一性等特点,酶在免疫分析方法中应用最为广泛,为高灵敏度分析方法的构建提供了重要元件。借助纳米颗粒^[19]、聚合物^[20]、抗原-抗体^[21]、生物素-亲和素^[22]等系统,将多个酶共同组装在一起而形成多酶颗粒,极大增加了单位反应单元的酶数量,提高了检测信号值^[23],从而达到提升检测灵敏度的目的^[24]。纳米科技的发展为多酶颗粒的制备提供了多种可能,新型的纳米材料,例如纳米金颗粒(AuNPs)、碳纳米管(carbon nanotubes, CNTs)等,具有尺寸小、比表面积大、荷载量大等优势,可作为酶的载体^[25],并且这些纳米材料还可较好地保存酶的催化活性,避免在苛刻条件下酶活性的丧失^[26]。笔

收稿日期:2021-10-11

基金项目:农业农村部污染防控重点实验室/天津市农业环境与农产品安全重点实验室开放课题项目(编号:19cdhj-8);镇江市科技创新资金(重点研发计划——社会发展)项目(编号:SH2020019)。
作者简介:陈斌(1996—),男,江苏丹阳人,硕士研究生,研究方向为环境污染物分析。E-mail:1013831825@qq.com。

通信作者:曾昆,博士,副教授,研究方向为环境污染物分析与生物效应。E-mail:kj80116@163.com。

者所在研究组前期分别合成了基于 AuNPs 和 CNTs 的多酶颗粒,发现以 CNTs 为载体的颗粒能够荷载更多的蛋白酶分子,具有更高的催化效率,并且对于免疫分析方法灵敏度的提升更为显著^[27]。

本研究以 CNTs 为载体,荷载酶蛋白分子,构建通用型的多酶信号颗粒,建立多酶辅助信号放大的 DON 免疫分析方法,并对市售谷物样本进行检测。该方法操作简单、快速、灵敏度高,可为谷物中 DON 的检测与监测提供有力的技术保障。

1 材料与方法

1.1 材料与仪器

羊抗鼠酶标二抗(HRP labelled Goat anti-mouse antibody, GAM-HRP),购自美国 Jacket 公司;明胶和 3,3',5,5'-四甲基联苯胺(3,3',5,5'-Tetramethylbenzidine, TMB),购自美国 Sigma 公司;超高纯羧基化单壁碳纳米管(single-walled carbon nanotubes, SWCNTs),购自江苏先丰纳米材料科技有限公司;DON 单克隆抗体以及 DON 包被原 OVA-DON,购自深圳市科捷实业发展有限公司;其他常规试剂购自国药集团。

多功能酶标仪(奥地利 Infinite 公司, Infinite M1000 PRO);磁力搅拌器(德国 IKA 公司, C-MAG HS4);低温高速离心机(德国 Eppendorf 公司, 5415D)。

1.2 试验方法

1.2.1 间接竞争 ELISA 方法检测 DON 的流程 在酶标板中,每孔加入 100 μL 适量稀释的 OVA-DON,4 $^{\circ}\text{C}$ 过夜;倒掉孔内液体,拍干后每孔加入封闭液 200 μL (PBS,0.01 mol/L,pH 值 7.4,含 1% 明胶),37 $^{\circ}\text{C}$ 孵育 2 h,倒掉孔内液体,拍干;采用 PBS(0.01 mol/L,pH 值 7.4)将 DON 标准品配制成分系列浓度,在每个孔中加入 50 μL DON 标准品,再加入 50 μL 经过适度稀释后的 DON 抗体,在 37 $^{\circ}\text{C}$ 下孵育培养 30 min;采用 PBST(含 0.5% Tween-20 PBS)洗涤 3 次并拍干,每个孔中加入 100 μL 适度稀释后的 GAM-HRP,37 $^{\circ}\text{C}$ 下孵育 30 min;PBST 洗涤 3 次并拍干,后在每个孔中加入现场配制的 TMB 显色液 100 μL ,37 $^{\circ}\text{C}$ 孵育 10 min;最后每孔加入 50 μL 终止液(2 mol/L H_2SO_4),并用酶标仪检测 450 nm 处吸光度。以 DON 标准品浓度的对数为横坐标, B/B_0 为纵坐标绘制标准曲线,其中, B 为不同浓度标准品对应的 D 值, B_0 为标准品浓度为 0 时,

对应的 D 值,即最大 D 值。计算半数抑制浓度(IC_{50})、最低检测限(IC_{90})和检测范围($\text{IC}_{20} \sim \text{IC}_{80}$)。

1.2.2 条件优化

1.2.2.1 最适抗原抗体浓度优化 通过使用棋盘法进行研究,寻找抗原抗体的最佳反应浓度。酶标板每行包被不同浓度的 OVA-DON,每孔加入 100 μL ,4 $^{\circ}\text{C}$ 过夜;洗涤及封闭同“1.2.1”节;将 DON 抗体用 PBS 缓冲液分别稀释至不同浓度,并依次加入至不同列孔板中,每孔 100 μL ,37 $^{\circ}\text{C}$ 孵育 30 min;其余洗涤、加入酶标记物、显色、终止等流程同“1.2.1”节。经过试验,把阳性对照/阴性对照(Positive/Negative, P/N) ≥ 2.1 ,且吸光度达约 1.0 时的抗原及一抗浓度作为最佳反应浓度,其中 $\text{P/N} = (D_{\text{标本}} - D_{\text{空白对照}}) / (D_{\text{阴性对照}} - D_{\text{空白对照}})$ 。

1.2.2.2 最适理化条件的优化 (1)最适 pH 值:配制 pH 值分别为 6.0、7.0、7.4、8.0 0.01 mol/L PBS 缓冲液,采用上述缓冲液稀释 DON 标准品,按“1.2.1”节方法进行检测,每组设置 3 个平行,绘制标准曲线并计算 IC_{50} 。(2)最适离子强度:分别配制离子强度为 0.01、0.05、0.1、0.15、0.20 mol/L 的 PBS 缓冲液(pH 值依据上述试验获得),采用上述缓冲液稀释 DON 标准品,按“1.2.1”节方法进行检测,每组设置 3 个平行,绘制标准曲线并计算其 IC_{50} 。(3)最适有机溶剂用量:分别配制含有 0%、10%、20%、30% 及 50% 甲醇的 PBS 缓冲液(pH 值和离子强度依据上述试验获得),采用上述缓冲液稀释 DON 标准品,按“1.2.1”节方法进行检测,每组设置 3 个平行,绘制标准曲线并计算其 IC_{50} 。

1.2.3 SWCNTs 多酶信号颗粒的制备与评估

1.2.3.1 SWCNTs 多酶信号颗粒的制备 0.2 mg 羧基化 SWCNTs,超声悬于 1 mL MES 溶液中,至 SWCNTs 完全分散;加入一定量的 GAM-HRP,4 $^{\circ}\text{C}$ 混合搅拌过夜;5 000 g/min 离心 10 min,去除上清液;将沉淀 SWCNTs/GAM-HRP 超声重悬于 1 mL 含有 2% BSA 的 MES 溶液中,4 $^{\circ}\text{C}$ 保存备用。对 SWCNT 上结合的 GAM-HRP 用量进行优化,分别加入 20、40、60、80 μg GAM-HRP,产物分别命名为 SWCNTs/GAM-HRP-1、SWCNTs/GAM-HRP-2、SWCNTs/GAM-HRP-3 和 SWCNTs/GAM-HRP-4。

1.2.3.2 SWCNTs 多酶信号颗粒的评估 应用“1.2.1”节和“1.2.2”节所建立优化后的 DON 间接竞争 ELISA 方法,将其中使用的 GAM-HRP 替换

为“1.2.3.1”节中合成不同 SWCNTs/GAM - HRP, 评估多酶颗粒的结合能力和信号放大效果。

1.2.4 基于多酶辅助信号放大的呕吐毒素检测方法的建立与优化

1.2.4.1 基于多酶辅助信号放大的呕吐毒素检测流程 包被、封闭、DON 抗体竞争结合步骤与“1.2.1”节相同;加入不同浓度 SWCNTs/GAM - HRP 颗粒,振荡条件下 37 ℃ 孵育 30 min;显色、终止及读值步骤同“1.2.1”节。

1.2.4.2 条件优化 为进一步提升方法性能,对 DON 抗体的工作浓度及 SWCNTs/GAM - HRP 颗粒的工作浓度进行优化。DON 抗体设置 3 个工作浓度(1:2 000、1:4 000 和 1:6 000),SWCNTs/GAM - HRP 设置 3 个工作浓度(1:10、1:20 和 1:40),同时设置不同 DON 标准品浓度(0.0、0.1、1.0 ng/mL)及空白对照(竞争步骤中,不加 DON 抗体以及 DON 标准品)。将不同浓度的 DON 抗体与不同浓度的 SWCNTs/GAM - HRP 进行交叉匹配,选择灵敏度最高的组合。

1.2.5 方法的性能评估

1.2.5.1 间接竞争性标准曲线 基于“1.2.4”节中优化条件,按照“1.2”节中试验流程,分别配制 DON 标准品浓度为 1、2、4、8、16 ng/mL,并绘制标准曲线,每组试验设 3 个平行。计算半数抑制浓度(IC_{50})、最低检测限(IC_{90})和检测范围($IC_{20} \sim IC_{80}$)。

1.2.5.2 交叉反应 选取 DON 结构类似物及不同真菌毒素(3 - Ac - DON、15 - Ac - DON、T - 2 毒素、ZEN、AFB1)做交叉反应的测定,对本试验方法的特异性进行评价。交叉反应(cross reactivity, CR) = $IC_{50}(\text{DON})/IC_{50}(\text{类似物}) \times 100\%$ 。

1.2.5.3 精密度 将基于多酶辅助信号放大的 DON 检测方法的标准曲线进行重复测定 10 次,第 2 天再次检测,计算批内和批间变异系数(coefficient of variation, CV)。

1.2.6 谷物样本的检测

1.2.6.1 添加回收试验 把大米、玉米和小麦的阴性样品进行粉碎,粉碎后通过 20 目筛,称取 10 g,加入 20 mL 20% 甲醇溶液,振荡 2 min,取 1 mL 上清液于 4 000 g/min 离心 5 min,吸取上清液,并稀释 10 倍,配制终浓度为 0、1、4、8 ng/mL DON 溶液,按“1.2.4.1”节方法进行检测。每种添加浓度重复 3 次,添加回收率 = (检测浓度 - 本底浓度)/实际添加浓度 $\times 100\%$ 。

1.2.6.2 实际样本检测 在江苏省镇江市大型超市中,采购大米、玉米和小麦样本各 5 种,应用“1.2.4.1”节方法进行检测。

2 结果与讨论

2.1 DON 间接竞争性 ELISA 的建立

ELISA 方法的建立是基于抗原与抗体的特异性反应,其中,包被原的浓度、抗体的浓度、反应的条件等均会不同程度地影响方法性能,因此需要对其进行优化。首先,采用棋盘法对抗原和抗体的浓度进行优化,由表 1 可知,通常选择 D 值在 1.0 左右的配对浓度作为最适条件,其中,包被原 1:500/抗体 1:8 000、包被原 1:1 000/抗体 1:4 000 和包被原 1:2 000/抗体 1:2 000 这 3 组均符合此条件。其中,第 1 组空白值偏高,选择包被浓度较高的一组(包被原 1:1 000/抗体 1:4 000)为最适工作浓度。

表 1 棋盘法筛选最适抗原与抗体浓度

抗体 稀释倍数	不同包被抗原稀释倍数下的 D 值					
	1:500	1:1 000	1:2 000	1:4 000	1:8 000	空白
1:500	2.96	2.42	2.10	1.29	0.78	0.14
1:1 000	2.56	2.11	1.34	0.91	0.69	0.05
1:2 000	1.96	1.47	1.03	0.71	0.47	0.04
1:4 000	1.55	0.95	0.65	0.42	0.31	0.05
1:8 000	1.07	0.71	0.56	0.39	0.23	0.03
空白	0.14	0.05	0.04	0.05	0.03	

其次,对反应的条件进行优化,包括 pH 值、离子强度以及有机溶剂含量。由图 1 可知,pH 值在 6.0~7.4 时, B_0 值变化不大,当 pH 值达 8.0 时, B_0 值略有增加;同时,当 pH 值为 7.4 时, IC_{50} 值最低。溶液的离子强度越高, B_0 值越小,而 IC_{50} 值随离子强度增加而增加。当离子强度为 0.01 mol/L 时, B_0 值最高而 IC_{50} 值最低。在实际样本检测时,需要加入有机溶剂作为提取液,因此,需要评估有机溶剂对反应的影响,选择常用的甲醇进行评估。该方法对甲醇的耐受性较好,当甲醇浓度低于 30% 时, B_0 值和 IC_{50} 值变化不大,当甲醇浓度达 50% 时,灵敏度显著下降。最终选用 0.01 mol/L PBS (pH 值 7.4, 含 20% 甲醇)作为样品溶液来稀释 DON 标准品。

基于以上优化条件,建立 DON 间接竞争检测标准曲线(图 2)。该方法线性范围 8.85~35.17 ng/mL, IC_{50} 为 18.13 ng/mL,检测限为 3.12 ng/mL。

2.2 SWCNTs 多酶信号颗粒的优化

以碳纳米管为载体,可荷载较多的蛋白酶颗粒

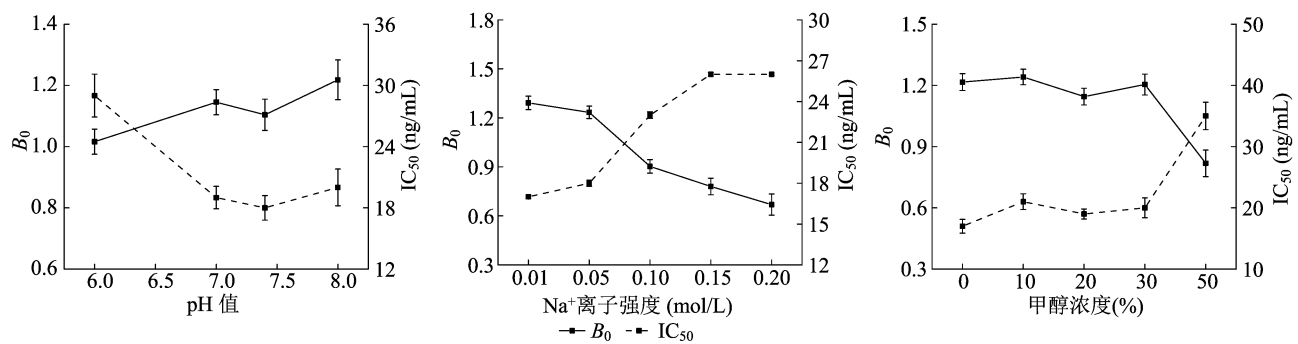


图1 pH 值、离子强度以及有机溶剂含量优化

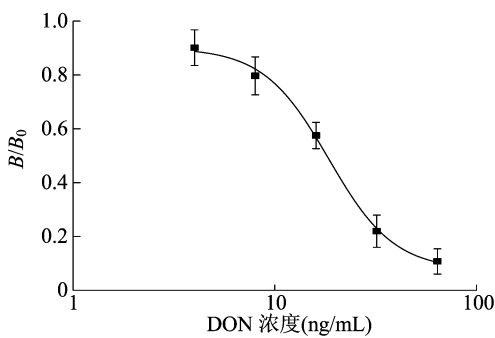
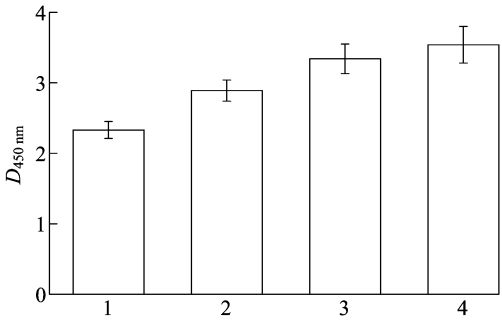


图2 DON 间接竞争标准曲线

放大检测信号,还可有效保留酶的活性^[26]。由图 3 可知,本研究中,将 GAM-HRP 偶联在 SWCNTs 上,形成一种通用的信号放大探针,可适用于间接 ELISA 方法,用于替代传统的酶标二抗,提升灵敏度。纳米材料上荷载的酶蛋白的量与方法的灵敏度直接相关,因此对 GAM-HRP 的用量进行优化。随着 GAM-HRP 用量的增加(从 20 μ g 至 80 μ g),同等条件下显色的 D 值显著增加。因此,后续试验中 GAM-HRP 的用量为 80 μ g,即采用 SWCNTs/GAM-HRP-4 作为信号放大元件。



1、2、3 和 4 分别代表 SWCNTs/GAM-HRP-1、SWCNTs/GAM-HRP-2、SWCNTs/GAM-HRP-3 和 SWCNTs/GAM-HRP-4

图3 GAM-HRP 用量优化

2.3 基于多酶辅助信号放大的呕吐毒素检测方法的建立及优化

引入合成的 SWCNTs/GAM-HRP-4,构建多酶辅助信号放大的呕吐毒素检测方法。由表 2 可

知,由于酶促信号的放大作用,对 DON 抗体和多酶信号颗粒的用量再次进行优化,同时设置不同的 DON 标准品,帮助评估每一种条件下方法的灵敏度。选择的标准为:(1)当 DON 标准品为 0 ng/mL 时,显色值在 1.0 左右;(2)不同的 DON 浓度条件下,显色呈现明显的梯度为佳;(3)为避免多酶信号颗粒吸附造成的背景干扰,空白值应尽可能小。根据以上条件,发现当 SWCNTs/GAM-HRP-4 用量较大(1:10)时,整体背景值均较高(空白超过 0.1);在试验中,通过增加洗涤次数、提高洗液中的表面活性剂 Tween-20 的含量,均不能有效降低背景。SWCNTs/GAM-HRP-4 用量为 1:20 和 1:40 时,背景值均较低。在 DON 抗体(1:12 000)/SWCNTs/GAM-HRP-4(1:20)和 DON 抗体(1:8 000)/SWCNTs/GAM-HRP-4(1:40)这 2 组条件,最大的 D 值均在 1.0 左右,同时前一组合在不同 DON 浓度下,梯度变化趋势更为明显,灵敏度更高。因此,确定最适的 DON 抗体浓度为 1:12 000,SWCNTs/GAM-HRP-4 最适浓度为 1:20。

表 2 DON 抗体和多酶信号颗粒的用量优化

多酶 信号颗粒	DON (ng/mL)	不同 DON 抗体浓度下的 D 值					
		1:4 000		1:8 000		1:12 000	
		平行 1	平行 2	平行 1	平行 2	平行 1	平行 2
1:10	0	3.25	3.13	3.01	2.87	2.56	2.47
	5	2.98	2.87	2.54	2.37	2.03	1.89
	50	1.71	1.82	1.55	1.49	1.21	1.31
	空白	0.15	0.18	0.19	0.19	0.16	0.18
1:20	0	2.23	2.34	1.78	1.89	1.23	1.12
	5	1.56	1.45	1.21	1.11	0.67	0.56
	50	0.98	0.78	0.54	0.54	0.23	0.21
	空白	0.05	0.05	0.06	0.07	0.04	0.03
1:40	0	1.56	1.49	1.13	1.08	0.87	0.79
	5	0.78	0.67	0.56	0.49	0.45	0.43
	50	0.45	0.48	0.31	0.29	0.21	0.19
	空白	0.05	0.03	0.04	0.04	0.03	0.05

基于以上优化后的反应条件,建立了基于多酶辅助信号放大的 DON 标准曲线。由图 4 可知,该方法的线性范围为 0.93 ~ 9.40 ng/mL, IC₅₀ 为 3.93 ng/mL,检测限为 0.63 ng/mL。相对于间接竞争 ELSA 方法,本方法的灵敏度提高约 5 倍(3.12 ng/mL 至 0.63 ng/mL)。在对方法进行优化的过程中,发现在同样的包被浓度条件下,基于多酶辅助信号放大的 ELISA 方法中抗体的用量(1:12 000)远小于间接竞争 ELSA 方法(1:4 000)。在与同样浓度的包被原和标准品竞争结合时,抗体越少,越容易被标准品完全抑制,显示出更高的灵敏度;但同时也会导致与包被原结合减少,信号强度降低,因此通过 SWCNTs/GAM-HRP 有效信号放大,保障了信号强度,使得灵敏度显著增加。与已报道的 DON 免疫分析方法相比(灵敏度分别为 9.83 ng/mL^[28]、1.0 ng/mL^[29]、2.97 ng/mL^[30]),所建立的新方法具有较好的灵敏度,能够满足食品中 DON 检测的要求。

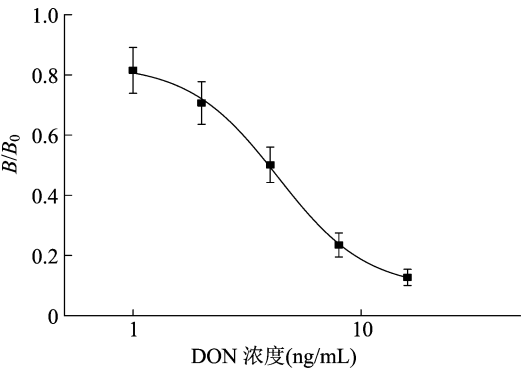


图4 基于多酶辅助信号放大的 DON 标准曲线

交叉反应结果见图 5。由图 5 可知,所建立的新方法仅与 3-Ac-DON 有较弱的交叉反应(4.4%),与 15-Ac-DON、T-2、ZEN、OTA 和 AFB1 无明显的交叉反应,这表示本方法具有良好的特异性。由表 3 可知,本方法的批内差在 3.67% ~ 9.09%,平均值为 7.27%;批间差在 4.72% ~ 13.78%,平均值为 9.57%。批内差和批间差均小于 15%,表明该方法具有较高的精密度。

2.4 谷物样本的检测

为评价新构建方法的实际应用性,对大米、小麦和玉米 3 种谷物的样品进行加标回收试验。由表 4 可知,方法回收率在 87.65% ~ 114.50% 之间,这个数据表明新方法在实际谷物样品 DON 的检测中具有较高的准确性。于 7 月在镇江市吉麦隆及大润发超

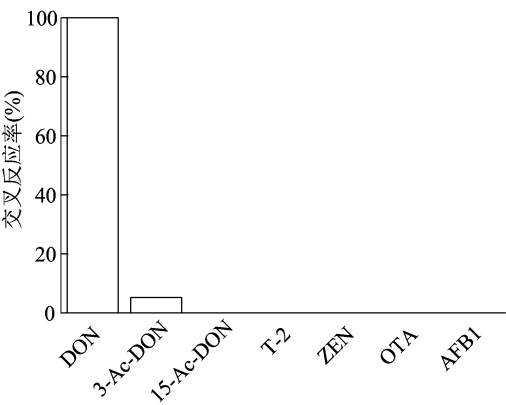


图5 基于多酶辅助信号放大的 DON 检测方法的特异性

表 3 ELISA 方法的批内和批间差异

DON (ng/mL)	批内差		批间差	
	均值(n=10)	CV(%)	均值(n=10)	CV(%)
0	1.21 ± 0.04	3.67	1.29 ± 0.09	6.65
1	0.96 ± 0.07	6.91	0.92 ± 0.07	8.06
2	0.85 ± 0.07	8.03	0.82 ± 0.04	4.72
4	0.61 ± 0.06	9.09	0.58 ± 0.06	11.34
8	0.28 ± 0.02	7.32	0.26 ± 0.03	12.85
16	0.15 ± 0.02	8.57	0.11 ± 0.02	13.78
平均值		7.27		9.57

表 4 基于多酶辅助信号放大的 DON 检测方法添加回收试验

样本	添加浓度 (ng/mL)	计算浓度 (ng/mL)	回收率 (%)
大米	0	< LOD	
	1	1.04 ± 0.09	103.65
	4	4.39 ± 0.18	109.74
	8	7.36 ± 0.36	92.03
玉米	0	< LOD	
	1	0.88 ± 0.03	87.65
	4	4.31 ± 0.28	107.77
	8	8.19 ± 0.57	102.49
小麦	0	< LOD	
	1	1.13 ± 0.07	113.21
	4	4.58 ± 0.23	114.50
	8	7.29 ± 0.42	91.13

市中采集了大米、小麦和玉米样品各 5 个,采用建立的新方法进行检测。由表 5 可知,15 个样本中 DON 检出浓度在 < LOD ~ 147.64 ng/g,检出率为 53.33%。

3 结论

新型纳米材料的发展为免疫分析方法中信号放大策略提供了新的契机。本研究以 SMWCNTs 为载体,荷载 GAM-HRP,构建通用型的多酶信号颗

表 5 实际样本检测结果

样本作物	样本编号	检测浓度(ng/g)
大米	R-1	< LOD
	R-2	43.56
	R-3	< LOD
	R-4	< LOD
	R-5	3.20
玉米	C-1	59.32
	C-2	< LOD
	C-3	106.32
	C-4	87.22
	C-5	< LOD
小麦	W-1	12.24
	W-2	147.64
	W-3	< LOD
	W-4	< LOD
	W-5	23.22

粒,建立了多酶辅助信号放大的呕吐毒素免疫分析方法;相较于间接竞争 ELSA 方法,该方法的灵敏度提高了约 5 倍(3.12 ng/mL 至 0.63 ng/mL);同时具有良好的特异性、准确性。对大米、小麦和玉米加标试验显示,回收率在 87.65% ~ 114.50% 之间;在 15 个谷物样本中 DON 检出浓度在 < LOD ~ 147.64 ng/g,检出率为 53.33%。该方法操作简单、快速、灵敏度高,可为谷物中真菌毒素及其他污染物的检测与监测提供有力的技术保障。

参考文献:

[1]周鸿媛. 脱氧雪腐镰刀菌烯醇(DON)的多代毒性及其联合毒性研究[D]. 无锡:江南大学,2018:1-7.

[2]韩 丽. 饲料中呕吐毒素单抗的研制及 icELISA 试剂盒和 GICA 试纸条检测方法的建立[D]. 石河子:石河子大学,2020:2-3.

[3]刘绍伟,罗仕欢. 浅谈霉菌呕吐毒素[J]. 湖南饲料,2006(2):26-27,34.

[4]王晓云. 玉米中脱氧雪腐镰刀菌烯醇的气相色谱分析[J]. 长治学院学报,2006,23(5):7-10.

[5]Collins T F X, Sprando R L, Black T N, et al. Effects of deoxynivalenol (DON, vomitoxin) on *in utero* development in rats [J]. Food and Chemical Toxicology,2006,44(6):747-757.

[6]Ren Z H, Deng Y T, Wang Y C, et al. Effects of the *Fusarium* toxin zearalenone and/or deoxynivalenol on the serum IL-1, IL-4, and C3 levels in mice[J]. Food and Agricultural Immunology,2016,27(3):414-421.

[7]Ran R, Wang C H, Han Z, et al. Determination of deoxynivalenol (DON) and its derivatives:current status of analytical methods[J]. Food Control,2013,34(1):138-148.

[8]国家卫生和计划生育委员会,国家食品药品监督管理总局 食

品安全国家标准 食品中真菌毒素限量:GB 2761—2017[S]. 北京:中国标准出版社,2017.

[9]Skovgaard N. Evaluation of certain mycotoxins in foods;fifty - sixth report of the Joint FAO/WHO Expert Committee on Food Additives [J]. World Health Organization Technical Report Series,2002,906:i - viii,1 - 62.

[10]郭红卫,朱元桢,柳启沛. 上海地区玉米和面粉中脱氧雪腐镰刀菌烯醇的污染调查[J]. 中国食品卫生杂志,1995,7(2):39-40.

[11]Omurtag G Z, Beyoğlu D. Occurrence of deoxynivalenol (vomitoxin) in beer in Turkey detected by HPLC [J]. Food Control,2007,18(2):163-166.

[12]Ok H E, Lee S Y, Chun H S. Occurrence and simultaneous determination of nivalenol and deoxynivalenol in rice and bran by HPLC - UV detection and immunoaffinity cleanup [J]. Food Control,2018,87:53-59.

[13]Vendl O, Berthiller F, Crews C, et al. Simultaneous determination of deoxynivalenol, zearalenone, and their major masked metabolites in cereal - based food by LC - MS - MS [J]. Analytical and Bioanalytical Chemistry,2009,395(5):1347-1354.

[14]Deng C, Li C, Zhou S, et al. Risk assessment of deoxynivalenol in high - risk area of China by human biomonitoring using an improved high throughput UPLC - MS/MS method [J]. Scientific Reports, 2018,8:3901.

[15]Xing K Y, Shan S, Liu D F, et al. Recent advances of lateral flow immunoassay for mycotoxins detection [J]. TrAC Trends in Analytical Chemistry,2020,133:116087.

[16]Pöhlmann C, Elßner T. Multiplex immunoassay techniques for on - site detection of security sensitive toxins [J]. Toxins, 2020, 12(11):727.

[17]Noubissi F K, McBride A A, Leppert H G, et al. Detection and quantification of γ -H2AX using a dissociation enhanced lanthanide fluorescence immunoassay[J]. Scientific Reports,2021,11:8945.

[18]Qiao Z H, Cai Q Q, Fu Y C, et al. Visual and quantitative detection of *E. coli* O157: H7 by coupling immunomagnetic separation and quantum dot - based paper strip [J]. Analytical and Bioanalytical Chemistry,2021,413(17):4417-4426.

[19]Jiang L, Wei D L, Zeng K, et al. An enhanced direct competitive immunoassay for the detection of kanamycin and tobramycin in milk using multienzyme - particle amplification [J]. Food Analytical Methods,2018,11(8):2066-2075.

[20]Li D Y, Cui Y L, Morisseau C, et al. Nanobody based immunoassay for human soluble epoxide hydrolase detection using polymeric horseradish peroxidase (PolyHRP) for signal enhancement; the rediscovery of PolyHRP? [J]. Analytical Chemistry, 2017, 89(11):6248-6256.

[21]Hu R, Liu T, Zhang X B, et al. Multicolor fluorescent biosensor for multiplexed detection of DNA [J]. Analytical Chemistry,2014,86(10):5009-5016.

[22]Zhang H, Shi Y P, Lan F, et al. Detection of single - digit foodborne pathogens with the naked eye using carbon nanotube - based multiple cycle signal amplification[J]. Chemical Communications

孙海红,董国强,蔡葵,等.油茶变态叶中糖类物质的单糖组成与抗氧化活性分析[J].江苏农业科学,2022,50(17):217-221.
doi:10.15889/j.issn.1002-1302.2022.17.035

油茶变态叶中糖类物质的单糖组成与抗氧化活性分析

孙海红¹,董国强²,蔡葵¹,吕享华¹,孙永红¹,薛鲁燕¹,张瑞巧¹,王文娇¹,赵征宇¹,石大川¹

(1. 青岛市农业科学研究院,山东青岛 266100; 2. 青岛市农产品质量安全中心,山东青岛 266100)

摘要:旨在从油茶(*Camellia oleifera* Able)正常叶片及其被细长叶表生菌[*Exobasidium gracile* (shirai) Syd]寄生后形成的变态叶片茶耳叶片中提取获得水提液及粗多糖,并对其进行一些理化性质、单糖组成和抗氧化活性的测定。采用水提法从油茶叶片中获得油茶叶滤液(CF)和茶耳滤液(TF),通过醇沉法获得油茶粗多糖(CCP)和茶耳粗多糖(TCP)。采用1-苯基-3-甲基-5-吡唑啉酮(PMP)柱前衍生高效液相色谱法、1,1-二苯基-2-三硝基苯肼(DPPH)自由基清除率和超氧阴离子清除率等方法进行理化性质、单糖组成及抗氧化活性的测定等理化性质和结构的分析。结果表明,被细长叶表真菌寄生后的茶耳的抗氧化性明显优于未被寄生的油茶叶,油茶叶多糖主要由甘露糖(Man)、氨基葡萄糖(GlcN)、半乳糖醛酸(GalUA)、葡萄糖(Glc)、半乳糖(Gal)5种单糖组成,比例为3.0%:5.8%:22.3%:19.7%:16.0%。茶耳多糖主要由甘露糖(Man)、半乳糖醛酸(GalUA)、葡萄糖(Glc)、半乳糖(Gal)4种单糖组成,比例为23.8%:20.7%:22.9%:6.7%。

关键词:细长叶表生菌;抗氧化活性;油茶

中图分类号: S794.401 **文献标志码:** A **文章编号:** 1002-1302(2022)17-0217-05

油茶(*Camellia oleifera* Abel)是山茶花中一种重要的木本食用油料树种,它主要分布于我国的湖南、湖北、江西、广西、浙江和福建等省份,是我国独有的一种食用油料树种,别称楂木,通常为常绿灌木林,有时为小乔木,高度为3~4 m,极少数可达

8 m。油茶树皮呈淡黄褐色,平滑但不裂;小枝微被短柔毛;单叶互生;叶柄长4~7 mm,有毛;叶片多为厚革质,形状为卵状椭圆形或卵形,长度为3.5~9.0 cm,宽度多为1.8~4.2 cm,其顶点相对较钝,基部呈楔形,边缘多呈细锯齿形,上部则呈亮绿色,通常为无毛或中脉有硬毛,下面中脉基部有毛或无毛,其侧脉不明显;花为两性花,1~3朵生于枝顶或叶腋上,直径达到3~5 cm,无梗;通常有5张萼片,形状接近圆形,外表面有被绢毛;花瓣数一般为5~7瓣,花色为白色,花分离,形状为倒卵形至披针形,长度多为2.5~4.5 cm,先端常有凹缺,外表面有

收稿日期:2021-05-17

基金项目:国家自然科学基金青年科学基金(编号:31800164);农业农村部农产品质量安全风险评估项目(编号:GJFP2019015)。

作者简介:孙海红(1978—),女,山东潍坊人,博士,高级工程师,主要从事农产品质量安全风险评估方面的研究。E-mail: sunhaihong@hotmail.com。

(Cambridge, England), 2014, 50(15): 1848-1850.

[23] Ansari S A, Husain Q. Potential applications of enzymes immobilized on/in nano materials: a review [J]. Biotechnology Advances, 2012, 30(3): 512-523.

[24] Xiong Y, Leng Y K, Li X M, et al. Emerging strategies to enhance the sensitivity of competitive ELISA for detection of chemical contaminants in food samples [J]. Trends in Analytical Chemistry, 2020, 126: 115861.

[25] Xie T, Wang A, Huang L, et al. Recent advance in the support and technology used in enzyme immobilization [J]. African Journal of Biotechnology, 2009, 8.

[26] Liu L, Hao Y Q, Deng D H, et al. Nanomaterials - based colorimetric immunoassays [J]. Nanomaterials, 2019, 9(3): 316.

[27] Zeng K, Wei D L, Zhang Z, et al. Enhanced competitive

immunomagnetic beads assay with Gold Nanoparticles and Carbon Nanotube - Assisted Multiple enzyme probes [J]. Sensors and Actuators B: Chemical, 2019, 292: 196-202.

[28] Xu Y, Yang H W, Huang Z B, et al. A peptide/maltose - binding protein fusion protein used to replace the traditional antigen for immunological detection of deoxynivalenol in food and feed [J]. Food Chemistry, 2018, 268: 242-248.

[29] Han L, Li Y T, Jiang J Q, et al. Development of a direct competitive ELISA kit for detecting deoxynivalenol contamination in wheat [J]. Molecules, 2019, 25(1): 50.

[30] Hou S L, Ma J J, Cheng Y Q, et al. Quantum dot nanobead - based fluorescent immunochromatographic assay for simultaneous quantitative detection of fumonisin B₁, deoxynivalenol, and zearalenone in grains [J]. Food Control, 2020, 117: 107331.