

# 基于时间分辨荧光纳米微球的呕吐毒素快速定量 检测试纸条的研制及性能研究

肖理文<sup>1</sup>、徐秀<sup>1</sup>、赵皖<sup>1</sup>、朱超<sup>2</sup>、陈爱亮<sup>2</sup>

1、上海飞测生物科技有限公司，上海； 2、 中国农业科学院农业质量标准与检测技术研究所，北京

**摘要：**本文成功研制开发了一种基于时间分辨荧光纳米微球的呕吐毒素快速定量检测试纸条，并在粮食谷物饲料等样品中对其检测性能进行了研究。该试纸条的检出限为 25 $\mu\text{g}/\text{kg}$ ，最低定量限为 82 $\mu\text{g}/\text{kg}$ ，线性范围为 100-5000 $\mu\text{g}/\text{kg}$ ，线性范围内的添加回收率为 83.51%~113.84%，同一个样本检测 3 次的 CV<14.75%，与其他真菌毒素的交叉反应率均小于 5%，与其代谢物的交叉反应率在 20%以内。具有操作简便、灵敏准确、快速定量、重现性好等优点，适合用于对粮食谷物饲料中呕吐毒素的进行快速定量测定。

**关键词：**呕吐毒素；荧光定量免疫层析；快速定量检测

呕吐毒素主体成分为 DON（deoxynivalenol,脱氧雪腐镰刀菌烯醇），属于单端孢霉烯族化合物，主要由禾谷镰刀菌、尖孢镰刀菌、串珠镰刀菌、拟枝孢镰刀菌、粉红镰刀菌、雪腐镰刀菌等镰刀菌产生

【1】。另外，头孢菌属、漆斑菌属、木霉属等菌株都可产生该毒素。单端孢霉烯族毒素共有 150 多种，是一类强有力免疫抑制剂，所引起典型症状是采食量降低，所以这类毒素又叫饲料拒食毒素。呕吐毒素（DON）是其中最重要的一种毒素，主要来自镰刀菌属（Fusarium），尤其是禾谷镰刀菌（Fusariumgraminearum）和黄色镰刀菌（Fusariumculmorum）。由于它可以引起猪的呕吐，故又名呕吐毒素（vomitoxin, VT）。

该毒素最早于 1970 年从日本香川县一次赤霉病大麦中毒的病毒中发现；1972 年，由日本的 Morooka 等首次从赤霉病大麦中分离，Yoshizawa 等阐明了这种新的真菌毒素的结构，并将其命名为 4-deoxynivalenol（DON）；1973 年 Vesonder 等在美国从被镰刀菌污染的玉米中分离出了同样的化学物质。呕吐毒素是食品中常见的真菌毒素，在自然界中广泛存在，在欧洲及北美常见的 3 种毒素是脱氧雪腐镰刀菌烯醇、3-乙酰脱氧雪腐镰刀菌烯醇和 15-脱氧雪腐镰刀菌烯醇。它们具有很高的细胞毒素及免疫抑制性质，会对人类及动物的健康构成威胁，特别是会对免疫功能造成明显的影响。根据 DON 的剂量和暴露时间的不同可引起免疫抑制或免疫刺激，当人摄入了被 DON 污染的食物后，会导致厌食、呕吐、腹泻、发烧、站立不稳、反应迟钝等急性中毒症状，严重时损害造血系统而造成死亡【2】。由于中国传统饮食习惯中粮谷比例大大高于西方，使得呕吐毒素的危害更为突出。1998 年，在国际癌症研究机构公布的评价报告中，呕吐毒素被列为 3 类致癌物。欧盟要求粮食谷物及其制品中呕吐毒素最高限量要小于

1.0mg/kg; 中国谷物饲料中要求粮食谷物及其制品中呕吐毒素的含量低于 1.0mg/kg, 饲料中低于 5 mg/kg 【3】。

目前, 国标法测定呕吐毒素采用 HPLC 法, 此方法需要大型的仪器设备, 设备价格昂贵, 操作过程复杂、时间较长, 且无法在现场和基础小型实验室使用。除此之外, 也有采用呕吐毒素酶联免疫试剂盒或胶体金快速检测试纸条等方法, 此类方法用于大量样品的筛查, 具有操作简便, 检测快速, 成本较低等优点, 但准确性和重复性较差, 容易造成假阳性或者假阴性。因此, 急需一种既简便快速, 又能准确定量的检测方法, 荧光定量免疫层析检测方法正好可以满足这种需求。本文研制了一种基于时间分辨荧光纳米微球的呕吐毒素快速定量检测试纸条, 并通过对多种粮食谷物饲料样品的实测, 验证了改呕吐毒素荧光定量快速检测试纸条的技术性能。

## 1 实验材料和方法

### 1.1 试剂和材料

除注明外, 均为分析纯, 试验用水均为 UP 水。

呕吐毒素抗原抗体、时间分辨荧光纳米微球 (210nm) 由上海飞测生物科技有限公司提供。

NC 膜 (135) 购自 millipore; 牛血清白蛋白 (BSA) 购自默克。

其他常规化学试剂均购自国药集团。

呕吐毒素及其他真菌毒素的标准品: 购自 Sigma 公司。

大米、玉米、小麦、面粉等样品从超市购得或从企业取样。

麸皮, 小麦、面粉等饲料样品从饲料厂和企业取样。

### 1.2 仪器与设备

FD-100 型荧光免疫定量分析仪和 FD-5000 型试纸条恒温孵育器, 由上海飞测生物科技有限公司提供; 高速离心机购自上海卢湘仪离心机仪器有限公司; 漩涡混匀器购自海门市其林贝尔仪器制造有限公司; 电子天平购自 Sartorius。

### 1.3 试验方法

#### 1.3.1. 荧光定量试纸条的组成与结构

a、荧光标记物结合垫: 将呕吐毒素抗体与羊抗鸡抗体分别与时间分辨荧光纳米微球偶联后, 喷涂于结合垫上, 37°C 干燥 24h, 干燥保存备用。

b、划有 C/T 线的 NC 膜: 在 135NC 膜上距离左端 10mm 处划上 0.5mg/ml 的呕吐毒素与牛血清白蛋白的结合物作为 T 线, 在 T 线右侧 5mm 处划上 1mg/ml 的鸡 IgG 作为 C 线, 37°C 干燥 24h, 干燥保存备用。

c、呕吐毒素荧光定量试纸条的组装: 在长 8cm 的 PVC 底板上, 依次搭接样品垫、荧光标记物结合垫、划有 C/T 线的 NC 膜和吸水纸, 切成 4mm 宽的细条, 放入卡壳中, 用压卡机压紧, 装入铝箔袋中, 加入 2 包 5g 的干燥剂, 密封保存即可。

#### 1.3.2. 样品的前处理

取具有代表性的待测样品 500g, 用小型粉碎机粉碎 1min 后过 20 目筛, 收集过筛后的均匀细小样品。称取过筛后的样品  $1.0 \pm 0.02g$  于 10mL 离心管中, 加入 5mL 提取液 (80% 的甲醇水溶液), 用漩涡混匀器振荡 5min (或者摇床振荡 10min) 后, 4000RPM 离心 1min, 取上清。

### 1.3.3. 检测过程

取 100 $\mu$ L 离心上清液加入 1000 $\mu$ L 样品稀释液中，用漩涡混匀器混匀 3-5s，然后取 100 $\mu$ L 加入到呕吐毒素荧光定量检测试纸条的加样孔中，置于 37 $^{\circ}$ C 恒温孵育器中温育 8min，8min 后将试纸条插入荧光免疫定量分析仪中读数，读数值即为样品的实际检测浓度。当检测值大于 5000 $\mu$ g/kg 时，可用提取液将离心上清液稀释 5 倍后再进行检测，所得读数值乘以对应的稀释倍数即为最终的检验结果。

## 2 检测结果分析

### 2.1 线性范围与检出限

取 7 个无污染（阴性）小麦样品和 7 个无污染（阴性）玉米样品，分别添加 100 $\mu$ g/kg、250 $\mu$ g/kg、500 $\mu$ g/kg、1000 $\mu$ g/kg、2500 $\mu$ g/kg、5000 $\mu$ g/kg 的呕吐毒素标准品，用呕吐毒素荧光定量检测试纸条每个样品检测 3 次，以添加浓度为纵坐标，以荧光定量检测试纸条的检测结果为横坐标，拟合曲线并计算线性相关系数，结果如下：

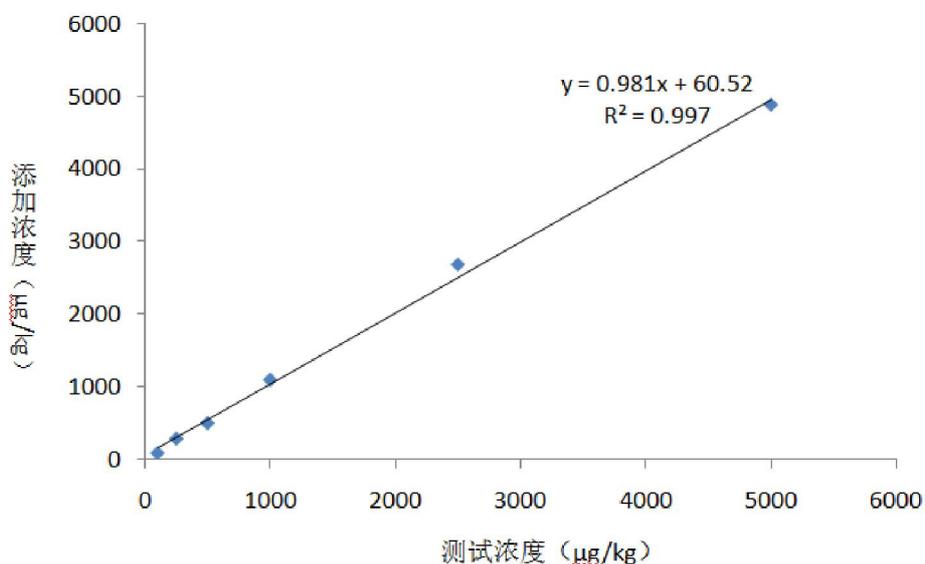


图 1 小麦中呕吐毒素标准品添加与呕吐毒素荧光定量试纸条检测值的线性关系

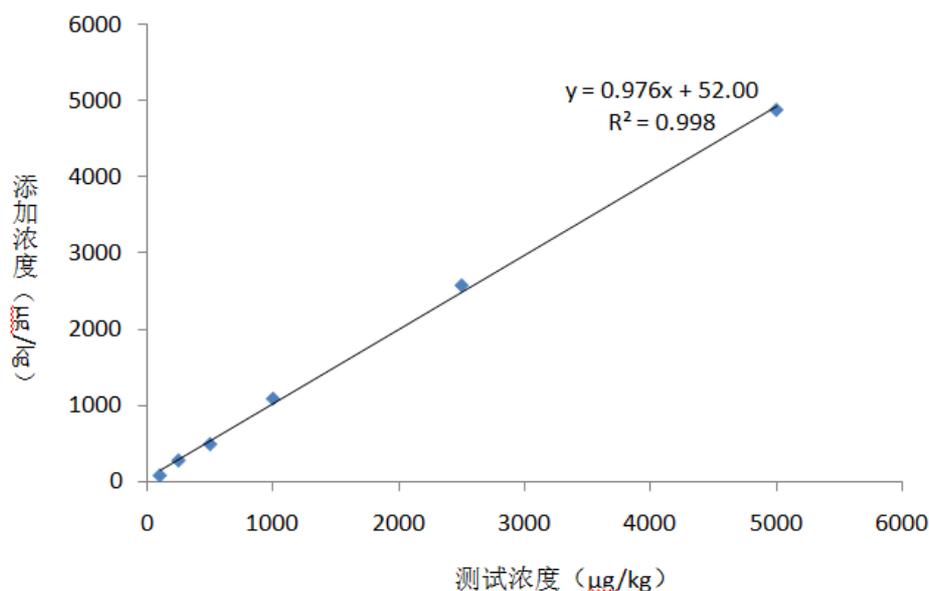


图 2 玉米中呕吐毒素标准品添加与呕吐毒素荧光定量试纸条检测值的线性关系

计算得出小麦的线性范围：100~5000 $\mu\text{g}/\text{kg}$ （6 点），回归方程： $y = 0.981x + 60.52$ ，相关系数  $R^2 = 0.997$ ；玉米的线性范围：100~5000 $\mu\text{g}/\text{kg}$ （6 点），回归方程： $y = 0.976x + 52.00$ ，相关系数  $R^2 = 0.998$ ；（见图 1 和图 2）。

取 10 个无污染（阴性）小麦样品和 10 个无污染（阴性）玉米样品，用呕吐毒素荧光定量检测试纸条每个样品检测 3 次，检测限（LOD）为测定平均值加 3 倍标准偏差，定量限（LOQ）为测定平均值加 10 倍标准偏差。测试结果表明，DON 的 LOD 为 25 $\mu\text{g}/\text{kg}$ ，LOQ 为 82 $\mu\text{g}/\text{kg}$ 。

## 2.2 准确性和重复性分析

在用国标法测定为 0 的空白样品中分别添加呕吐毒素总量为 100, 250, 500, 1000, 2000, 5000 $\mu\text{g}/\text{kg}$ ，然后按照呕吐毒素荧光定量检测试纸条的检测方法进行检测。检测结果见表 1。

表 1 不同样本检测的准确性和重复性

样本	平行试验	呕吐毒素添加量 ( $\mu\text{g}/\text{kg}$ )					
		100	250	500	1000	2000	5000
大米	1	85.11	238.22	550.48	1177.61	2163.89	>5000
	2	96.24	292.53	498.09	996.97	2213.41	>5000
	3	104.88	287.88	532.44	1109.43	2290.42	>5000
检测平均值 ( $\mu\text{g}/\text{kg}$ )		95.41	272.88	527.00	1094.67	2222.57	>5000
平均回收率		95.41%	109.15%	105.40%	109.47%	111.13%	-----
变异系数 CV		10.39%	11.03%	5.05%	8.33%	2.87%	-----
玉米	1	84.91	206.35	550.71	1168.65	2312.11	>5000
	2	109.43	198.88	512.57	1046.64	2015.44	>5000
	3	92.02	221.09	533.23	1099.93	2175.27	>5000

检测平均值 (µg/kg)		95.45	208.77	532.17	1105.07	2167.61	>5000
平均回收率		95.45%	83.51%	106.43%	110.51%	108.38%	-----
变异系数 CV		13.22%	5.41%	3.59%	5.54%	6.85%	-----
小麦	1	84.91	239.35	577.71	1168.65	2312.11	4976.15
	2	89.43	302.88	550.57	1146.64	2015.44	>5000
	3	92.02	282.09	539.23	1099.93	2175.27	>5000
检测平均值 (µg/kg)		88.79	274.77	555.84	1138.41	2167.61	-----
平均回收率		88.79%	109.91%	111.17%	113.84%	108.38%	-----
变异系数 CV		4.05%	11.79%	3.56%	3.08%	6.85%	-----
面粉	1	113.13	287.93	509.07	940.74	2378.39	>5000
	2	118.68	262.21	566.04	1108.73	2112.45	>5000
	3	89.02	244.32	546.44	1137.03	2352.04	>5000
检测平均值 (µg/kg)		106.94	264.82	540.52	1062.17	2280.96	>5000
平均回收率		106.94%	105.93%	108.10%	106.22%	114.05%	-----
变异系数 CV		14.74%	8.28%	5.35%	9.99%	6.42%	-----

从表 1 可以看出, 所研制的呕吐毒素荧光定量检测试纸条测试不同粮食谷物中呕吐毒素的添加回收率在 83.51%~113.84%, 3 次重复的变异系数在 14.74% 以内。

### 2.3 与色谱法的对比试验结果

取大米、小麦、玉米、面粉、麸皮、喷浆玉米、大豆、豆粕等受污染样品各 1 份, 先采用国标液相色谱法进行测定, 再使用所研制的呕吐毒素荧光定量检测试纸条进行测定, 各测试 3 个平行样。检测结果如下:

表 2 呕吐毒素荧光定量检测试纸条与液相色谱法检测值比对 (µg/kg)

样本	大米	小麦	玉米	面粉	麸皮	喷浆玉米	大豆	豆粕	
色谱值	1420.323	802.095	347.09	1890.966	4290.024	1276.420	2209.442	68.502	
定量试纸条测试值	1	1509.10	889.22	422.36	2099.31	4786.03	1394.44	2503.56	73.04
	2	1433.43	948.34	390.02	2011.03	4603.89	1203.09	2557.48	63.09
	3	1579.32	867.56	379.48	2133.03	4580.53	1334.04	2314.75	77.67
平均值	1507.28	901.71	397.29	2081.12	4656.82	1310.52	2458.60	71.27	
符合度	106.12%	112.42%	114.46%	110.06%	108.56%	102.67%	111.28%	104.04%	
CV	4.84%	4.64%	5.62%	3.03%	2.42%	7.46%	5.18%	10.45%	

表 2 表明, 在不同的粮食谷物饲料中, 所研制的呕吐毒素荧光定量检测试纸条检测值与液相色谱法检测值的符合率为 102.67%~114.46%, 3 次重复测定的 CV 值在 10.45% 以内。

## 2.4 方法特异性

选择 DON 结构类似物和其他 5 种真菌毒素的标准品在阴性玉米中进行添加，添加的浓度为 1000 $\mu\text{g}/\text{kg}$ ，然后用呕吐毒素荧光定量检测试纸条进行测试，每个样品测 3 次取平均值；结果显示与赭曲霉毒素 A，伏马菌素 B1，黄曲霉毒素 B1、T-2 毒素、玉米赤霉烯酮交叉反应率均 $<5\%$ ，与其代谢物、结构类似物有一定的交叉反应（ $<20\%$ ）。实验结果表明，呕吐毒素荧光定量检测试纸条对赭曲霉毒素 A，伏马菌素 B1，黄曲霉毒素 B1、T-2 毒素、玉米赤霉烯酮几乎无交叉反应，其方法特异性可以满足检测要求。

表 3 交叉反应率表

序号	名称	测定值	交叉反应率
1	呕吐毒素 (DON)	1124	100.00%
2	赭曲霉毒素 A (OTA)	36	3.6%
3	伏马菌素 B1 (FB1)	41	4.1%
4	黄曲霉毒素 B1(AFB1)	25	2.5%
5	玉米赤霉烯酮(ZEN)	29	2.9%
6	T-2 毒素(T-2)	47	4.7%
7	3-乙酰基脱氧雪腐镰刀菌烯醇	138	13.8%
8	15-乙酰基脱氧雪腐镰刀菌烯醇	165	16.5%

## 3 结论

本文成功的开发了一种呕吐毒素荧光定量检测试纸条，并对不同的粮食谷物饲料样本进行测试，评估其性能，结果显示，该产品的检出限为 25 $\mu\text{g}/\text{kg}$ ，最低定量限为 82 $\mu\text{g}/\text{kg}$ ，线性范围为 100-5000 $\mu\text{g}/\text{kg}$ ，线性范围内的添加回收率为 83.51%~113.84%，同一个样本的检测 3 个样本的 CV $<14.74\%$ ，与其他真菌毒素的交叉反应率均小于 5%，与其代谢物的交叉反应率在 20%以内。其准确性和可靠性均可以满足欧盟和我国对呕吐毒素的分析标准的技术要求，且该方法具有简便快速、准确可靠、重复性好等特点，可用于不同粮食谷物饲料中呕吐毒素的快速定量检测分析。

### 参考文献：

- 【1】刘绍伟,罗仕欢.浅谈霉菌呕吐毒素[J].湖南饲料, 2006(2):26- 27.
- 【2】阳传和,刘 畅,罗雪云,等.小麦中脱氧雪腐镰刀菌烯醇酶联免疫吸附测定方法的研究[J].微生物学报, 1994, 34(1): 65-70.
- 【3】中华人民共和国国家标准 GB/T8381.6-2005,配合饲料中脱氧雪腐镰刀菌烯醇的测定薄层色谱法 [S].