



ELISA在检测饲料黄曲霉毒素总量中的应用

作者:陈玲 陈丽 冯建文等 期号:2006年第21期

摘要 实验研究了酶联免疫吸附法(ELISA)测定饲料中黄曲霉毒素总量的方法。采用70%甲醇萃取饲料中黄曲霉毒素,应用固相直接竞争酶联免疫吸附原理,建立标准反应曲线 $Y=-21.1X+120.11$, $R^2=0.998$ 。该方法简单、快捷、准确,回收率在97.71%~102.74%之间。

关键词 黄曲霉毒素;酶联免疫吸附法;检测

中图分类号 S816.17

随着国家对饲料卫生指标的日益关注,饲料中黄曲霉毒素含量是否超标也逐步受到重视。饲料原料及配合饲料采集后贮存不当或在制备和加工过程中处理不善,可能造成霉菌感染并产生霉菌毒素。其中,黄曲霉毒素(Aflatoxin)危害最大、毒性极强。黄曲霉毒素是黄曲霉菌和寄生曲霉菌产生的一组有毒代谢物,长期食用含低浓度黄曲霉毒素的饲料将导致动物胚胎内中毒,通常年幼的动物对黄曲霉毒素更为敏感[1]。黄曲霉毒素中毒主要表现为消化系统功能紊乱、生育能力降低、饲料利用率降低、贫血、牛奶产量下降和鸡产蛋率下降,动物的免疫力有所降低,易受有害微生物的感染。我国饲料黄曲霉毒素污染率很高,给饲料企业和养殖业带来了很大损失。因此,要加强对饲料中黄曲霉毒素控制的力度。

目前黄曲霉毒素检测的主要方法有:薄层法(TLC)、高效液相色谱法(HPLC)、免疫亲和柱荧光光度法、酶联免疫吸附法(ELISA)、快速荧光法[2]。本文建立了酶联免疫吸附分析法(ELISA)测定饲料中黄曲霉毒素含量的方法,所涉及的仪器及试剂比较少,试验步骤也比较简单,是一种先进、快速、灵敏、准确、经济、简单、安全的方法。

1 材料与试剂

1.1 主要仪器与试剂

分析天平、分样筛(20目)、酶标仪、八道移液枪(微量可调移液器)及吸头、粉碎机、玻璃器皿、磁力搅拌器等,甲醇。

1.2 试剂盒组成

试剂盒为新加坡ROMER公司产品,包括黄曲霉毒素标准品系列(浓度分别为0、1.0、2.5、5.0、10.0、20.0 $\mu\text{g}/\text{kg}$)、黄曲霉毒素酶联耦合剂、底物、终止液、96孔抗体包被的酶标板。

2 测定原理及方法

2.1 ELISA测定黄曲霉毒素的原理

应用固相直接竞争酶联免疫吸附原理检测黄曲霉毒素(Aflatoxin),将酶标记的黄曲霉毒素与样品提取液混合加入到预先抗体包被的酶标板中,样品提取液中的黄曲霉毒素与酶联耦合剂竞争结合孔中的特异抗体。经充分反应后,加入底物,微孔颜色变为蓝色,所显颜色深浅与样品提取液中黄曲霉毒素含量成反比。加入终止液后,反应终止,微孔颜色由蓝色转为黄色。将微孔板放入酶标仪中在波长450 nm(OD450)下测其吸光度,参照标准曲线计算出饲料样品中黄曲霉毒素含量。

2.2 取样

将具有代表性的饲料原料及配合饲料约1 kg粉碎,使至少75%的饲料样品能够通过20目筛网,混合均匀,用四分法进行取样。

2.3 样品处理

准确称取20 g左右的饲料样品置于干净有盖的广口瓶中,加入100 ml甲醇水溶液(V甲醇:V水=70:30)萃取,盖上瓶盖,并在磁力搅拌器上搅拌5~10 min。

2.4 纯化

静置后用滤纸过滤上清液,收集滤液待测,注意样品萃取液的pH值为6~8。

2.5 ELISA试剂盒测定饲料样品中黄曲霉毒素的含量

将所有试剂放至室温后进行下面操作。

2.5.1 稀释

将稀释液放到微孔架上,用移液枪移取酶联耦合剂200 μl 到每个稀释孔中。移取100 μl 的标准品及饲料样品至已装有200 μl 酶联耦合剂的稀释孔中,反复抽吸稀释孔3次,对稀释孔中液体进行充分混匀。

2.5.2 反应

移取每个稀释孔中的液体100 μl 到相应的被抗体包被的微孔中,室温下孵育15 min。

2.5.3 洗涤

孵育15 min后,将微孔中的液体倒入废液缸中,用蒸馏水冲洗每个微孔,然后将微孔板倒置在滤纸上拍打,这样来回冲洗5次,拍干,尽可能使微孔中的水分排出。

2.5.4 显色与终止

向每个微孔中加100 μl 的底物,在室温下孵育5 min,然后向每个微孔中加100 μl 的终止液。

2.5.5 定量测定

用酶标仪在波长450 nm处测定吸光度(OD)值,绘制黄曲霉毒素的标准曲线,确定饲料样品中黄曲霉毒素的含量。

2.6 回收率实验

考虑到饲料样品中提取的黄曲霉毒素对其吸收度是否存在影响因素以及结果的准确性和可靠性,分别在这5个饲料样品(各20 g)中加入10 $\mu\text{g}/\text{kg}$ 的黄曲霉毒素的标准品35 μl ,进行回收率实验。

3 测定结果

3.1 标准曲线的绘制

以零标准的吸光度值的百分数(吸光度值 \times 100/零标准吸光度值)为纵坐标,以5个标准的浓度对数(IgC)为横坐标,绘制标准反应曲线(见图1)。

相关文章

- 饲用油脂的质量指标及掺假的...
- 气相色谱法测定猪肉脂肪酸组...
- 抗坏血酸(VC)微囊的质量检...
- 气相色谱-质谱联用法测定饲料...
- 饲料中三种硝基咪唑类药物的...
- 几种重要蛋白原料的掺假与鉴...
- 豆粕中尿素酶活性检测方法的...
- 不确定度评定在饲料卫生学毒...
- 凯氏定氮法测定饲料中粗蛋白...
- 黄曲霉毒素检测方法的研究
- 饲料中盐酸多巴胺的HPLC检测...

合作伙伴



图1 标准曲线

3.2 饲料样品中黄曲霉毒素的含量测定(见表1)

表1 饲料样品中黄曲霉毒素的含量

样品	黄曲霉毒素含量($\mu\text{g}/\text{kg}$)
玉米	12.04
豆粕	2.35
麸皮	10.65
黄粉	19.18
配合饲料	16.89

3.3 回收率实验结果(见表2)

从标准物添加回收情况来看,回收率在97.71%~102.74%之间,实验结果令人满意。

表2 回收率实验结果

样品号	加入黄曲霉毒素浓度($\mu\text{g}/\text{kg}$)	测定值($\mu\text{g}/\text{kg}$)	回收率(%)
S2236	17.50	17.10	97.71
S3625	17.50	17.98	102.74
S2277	17.50	17.33	99.03
S2238	17.50	17.27	98.68
S2290	17.50	17.30	98.86

4 分析与讨论

4.1 霉菌毒素的污染具有分布极不均匀性,在一批饲料原料中可能只有少数几粒污染,而另一批中污染的水平可能非常高。同时,霉菌毒素的污染是基于“ $\mu\text{g}/\text{kg}$ ”水平的,即十亿分之一。基于以上两点原因,测量霉菌毒素含量的过程中取样环节产生的误差最大,约占总误差的85%以上,所以取样要特别慎重。检测霉菌毒素含量时,取样这一环节非常重要,一定要有代表性。

4.2 本实验纯化过程时注意样品萃取液的pH值为6~8,样品液的pH值过高、过低都会影响检测结果。所以,检测前就需要调整好样品液的pH值。有研究发现:当样品提取液的pH值低于5时,酶标抗原中的酶的结构发生不可逆的变化,并丢失其大部分活性,导致显色反应时颜色偏浅,结果出现假阳性[3]。

4.3 通过回收率实验及对饲料样品中黄曲霉毒素含量测定的结果证明,固相直接竞争酶联免疫吸附法用于检测饲料黄曲霉毒素含量测定结果准确可靠,方法简便,所涉及的仪器及试剂比较少,实验步骤也比较简单,是目前国内外较为先进的检测方法,快速、灵敏而且经济安全。

5 结语

我国的饲料工业还处于发展之中,体制还不健全,对饲料中霉菌及其毒素污染没有足够重视。因此,饲料生产、管理、经营和消费部门都应加强对饲料及原料的质量控制和管理,重视和改进饲料及原料的生产、加工、运输、贮存条件,防止霉菌污染,提高饲料质量。

参考文献

- 1 武兴金.饲料中霉菌毒素的危害及其防治措施[J].贵州畜牧兽医,2005(4):21~22
- 2 张华,赵丽芬.饲料中霉菌和霉菌毒素的检测方法[J].贵州农业科学,2004,32(5):86~87
- 3 柏凡,王宇平.有机萃取法对ELISA检测饲料中AFB1结果的影响[J].中国饲料,2004(11):36~38
(编辑:崔成德, cuicengde@tom.com)

...评论...

发表
评论

*40字以内

提交

重置