

赤霉毒素脱氧雪腐镰刀菌烯醇(DON)酶联免疫检测方法研究

李 华, 祭 芳, 徐剑宏, 王裕中, 史建荣

(江苏省农业科学院食品质量安全与检测研究所, 南京 210014)

摘要: 【目的】建立快速、灵敏、有效的毒素检测方法, 以保证麦类作物的安全生产以及谷物食品的安全性。【方法】以主要赤霉病菌毒素脱氧雪腐镰刀菌烯醇(DON)为对象, 利用半琥珀酰化脱氧雪腐镰刀菌烯醇的牛血清蛋白偶联物(3-HS-DON-BSA)作免疫原, 分别采用腹腔注射法和颈、背部多点注射法免疫 Balb/c 小鼠和豚鼠, 获得 DON 的多抗血清, 建立间接 ELISA 检测方法。【结果】多抗豚鼠血清的效价达到 1:6 400, 而小鼠混合血清的效价则为 1:12 800。引起 DON 抗体最大结合 50%抑制时, 所需 DON 及其类似物 3-Ac-DON 和 T-2 毒素的量分别为 $63\mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$ 、 $114\mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$ 和 $>1\ 000\mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$; 相对交叉反应率分别为 100%, 55.2%和 6.3%。包被抗原的最适工作浓度为 1/1 500, 小鼠血清工作浓度为 1/1 600。在包被原和小鼠血清的最适工作浓度下, 20%以上的甲醇稀释度对 DON 免疫分析有显著的影响, 低于 10%浓度的甲醇对 DON 免疫分析基本无影响。建立的间接竞争 ELISA 法检测范围为 $0.01\sim 100\mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$, 检出限为 $0.02\mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$, 平均回收率为 82%~93%, 精密度(CV%)为 4.65%~21.3%。【结论】本文提出的毒素检测方法, 检测成本低, 方便易行, 不仅可以应用于小麦赤霉病的病理学研究, 也可广泛应用于谷物及其制品中 DON 毒素的含量检测, 具有较好的应用价值。

关键词: 脱氧雪腐镰刀菌烯醇; 免疫学检测; ELISA; 小麦赤霉病

Enzyme-Linked Immunosorbent-Assay for Deoxynivalenol (DON)

LI Hua, JI Fang, XU Jian-hong, WANG Yu-zhong, SHI Jian-rong

(Institute of Food Safety, Jiangsu Academy of Agricultural Sciences, Nanjing 210014)

Abstract: 【Objective】To detect Fusarium toxin Deoxynivalenol (DON), a trichothecene mycotoxin occurring in FHB contaminated grain, an indirect competitive enzyme-linked immunosorbent assay (ELISA) was developed. 【Method】Conjugation of DON to carrier proteins was facilitated by conversion of DON to 3-O-hemisuccinyl-DON(3-HS-DON). 3-HS-DON-bovine serum albumin (3-HS-DON-BSA) and 3-HS-DON-ovalbumin (3-HS-DON-OVA) were allowed to produce DON-specific mice antisera. 3HS-DON-OVA was coated onto the microplate, followed by incubation with DON and anti-DON antibody. 【Result】The indirect competitive ELISA revealed that the optimal concentration of mice serum and the coated antigen were 1/1 600 and 1/1 500, respectively. The antiserum cross-reacted with 3-AC-DON and T-2 at about 55.2% and 6.3% as much as they did with DON. Studies on the effect of methanol on reaction between the antiserum and DON showed that the assay could be performed effectively by using an extraction buffer containing less than 15% methanol. Recovery of DON was 82%-93% in grains with coefficients of variation of 4.65% to 21.3% at the range of tested dosage. The linear detection range was between 0.01 and $100\mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$. 【Conclusion】This ELISA can be applied for the detection of DON in grains.

Key words: Deoxynivalenol (DON); Immunoassay; ELISA; Fusarium head blight

0 引言

【研究意义】脱氧雪腐镰刀菌烯醇(DON)是由小麦赤霉病菌(*Fusarium graminearum*)产生的重要

真菌毒素^[1,2], 不仅在赤霉病发展过程中具有重要作用^[3,4], 而且对人畜具有高度危害性, 可致呕吐、腹泻、发烧等急性中毒症状, 与贫血、免疫抑制、食管癌、克山病也具有密切联系^[5~7]。因此受该毒素污染严重

收稿日期: 2006-01-10; 接受日期: 2006-10-10

基金项目: 农业部 948 项目(201053), 江苏省自然科学基金(BK2006563)

作者简介: 李华(1978-), 男, 湖北潜江人, 硕士, 研究方向为真菌毒素。通讯作者史建荣(1963-), 男, 浙江省慈溪人, 研究员, 博士, 研究方向为真菌毒素与植物病害控制。E-mail: shiji@jaas.ac.cn; Tel: 025-84392001

的大、小麦不能直接供人畜食用。对于以啤酒大麦为主的大麦生产区,毒素的威胁尤为严重。在美国北达科塔州,赤霉病曾导致大量啤酒大麦改作饲料,重病田块甚至弃收或者烧毁^[8]。由于赤霉病的普遍发生,建立快速、灵敏、有效的毒素检测方法显得十分迫切。【前人研究进展】真菌毒素的检测传统上一直是色谱化学技术为基础,如薄层层析(TLC)、气相色谱(GC)、高效液相色谱(HPLC)以及质谱(MS)分析技术,尤其是后3种方法,能够精确地确定毒素的种类和含量^[9-13]。但是这类分析方法所需的仪器设备投资昂贵,而且检测比较费时费力,具有明显的局限性。【本研究的切入点】以免疫抗体为基础的免疫检测技术,克服了仪器分析样品处理繁复、仪器使用成本高的局限,是一类快速、敏感且操作简单的分析方法,在毒素和有毒化合物等小分子化合物的检测中应用已十分广泛^[14-17]。【拟解决的关键问题】作者利用半琥珀酰化的DON与牛血清蛋白的偶联物作为免疫原,对DON的多抗血清制备方法以及固体样品中DON的酶联免疫吸附检测进行了研究,以期建立简便可靠的毒素检测方法。

1 材料与方 法

1.1 供试材料

实验动物 Balb/c 雄性小鼠购于南京军区总医院实验动物中心,豚鼠购于江苏省农科院实验动物中心。DON 经与琥珀酸酐反应获得 3-半琥珀酰-DON,再与牛血清蛋白偶联而成具有抗原性的免疫原,3-半琥珀酰-DON-牛血清蛋白(3-HS-DON-BSA)。包被原为 3-半琥珀酰-DON-卵清蛋白(3-HS-DON-OVA),合成方法同上。福氏完全佐剂和福氏不完全佐剂,购于 Sigma 公司。羊抗鼠酶标二抗,购于华美生物工程公司。卵清蛋白,购于武汉中健科技发展有限公司。DON 为本实验室保存。ABTS 购于 Roche 公司。所有其它试剂均为分析纯。

1.2 试验方法

1.2.1 免疫 参考 Casale^[15]的方法,并加以改进。将抗原 3-HS-DON-BSA 稀释后,与福氏完全佐剂以 1:1 的比例乳化。初次免疫剂量为 100~250 $\mu\text{g}/\text{Balb/c}$ 小鼠和 250~500 $\mu\text{g}/\text{豚鼠}$ 。免疫途径分别为小鼠腹腔注射法和豚鼠颈、背部多点注射法。加强免疫同初次免疫,但所用抗原采用福氏不完全佐剂乳化,免疫剂量减半。末次加强免疫所用抗原不加佐剂,肌肉注射。

1.2.2 抗体特性测定 采用非竞争间接 ELISA 法测定抗体效价。以酶促反应吸光值大于阴性血清吸光值 2 倍的孔所对应的最大抗体稀释度定为抗体效价。在包被抗原浓度 1/800 下,分别以不同浓度的 DON、3-Ac-DON、15-Ac-DON、T-2 与倍比稀释的抗血清进行竞争 ELISA 实验。采用 Abraham 法表示交叉反应。计算公式 $Y=(S/Z) \times 100\%$,其中 S 表示标准抗原与 50%抗体结合时的浓度,Z 表示标准抗原类似物与 50%的抗体结合时的浓度^[16]。

1.2.3 包被原和血清工作浓度的测定 将抗血清梯度稀释(1:400, 1:800, 1:1600, 1:3200)于 PBS 中后,采用间接竞争 ELISA 法和方阵滴定的方法优化包被原和抗血清的工作浓度。

1.2.4 有机溶剂对 ELISA 法测定 DON 的影响 建立含不同浓度甲醇的工作缓冲液抑制曲线,根据所得曲线确定工作溶剂量对分析的影响。

1.2.5 测试样品的制备 将待测小麦磨碎成粉状后,各取 4 g 用 20 ml 甲醇-水(10:90, V/V)浸 1 h,提取液用定量滤纸过滤。根据小麦赤霉病的发生程度,将滤液直接或用 PBST 稀释后,进行 ELISA 检测。

1.2.6 标准曲线的建立 采用间接竞争 ELISA 方法建立标准曲线,将 DON 标准品用含 10%甲醇的 PBS 倍比稀释(0.001~1000 $\mu\text{g}\cdot\text{ml}^{-1}$),以无 DON 抑制时的 OD 值为 B_0 值,相应浓度 DON 抑制时的 OD 值为 B 值,以抑制率 $1-B/B_0$ 为纵坐标,以 DON 浓度的对数为横坐标,利用 CurveExpert (version 1.38; Daniel Hyams, Starkville, MS) 软件分析拟合并绘制标准曲线,建立回归方程。

1.2.7 回收试验 将小麦籽粒用 1% Na_2CO_3 进行脱毒处理,然后分别加入 0.5 $\mu\text{g}\cdot\text{ml}^{-1}$ 、10 $\mu\text{g}\cdot\text{ml}^{-1}$ 和 200 $\mu\text{g}\cdot\text{ml}^{-1}$ 的 DON 系列标准溶液,采用提取待测小麦样品的方法和步骤处理后,进行间接竞争 ELISA 测定。精密度和回收率的计算参考 Casele 的方法^[15]。

1.2.8 间接竞争 ELISA DON-OA 或者 OA (对照)用 50 $\text{mmol}\cdot\text{L}^{-1}$ 碳酸盐缓冲液(pH 9.6)梯度稀释,分别加入酶标板孔中包被,每孔加 100 μl ,4 $^{\circ}\text{C}$ 过夜。用含 0.05%Tween-20 的 0.1 $\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$ 磷酸钠缓冲液(PBS-T)洗板。将 OA 稀释至 1%,按 300 $\mu\text{l}/\text{孔}$ 加到 96 孔中封闭,37 $^{\circ}\text{C}$ 温育 60 min, PBS-T 洗板。DON 标准液或样品提取液与等体积抗体混合并振荡,室温静置 15 min 后加入酶标板孔中,每孔 100 μl 。在 37 $^{\circ}\text{C}$ 下温育 60 min 后, PBS-T 洗板。将辣根过氧化物酶标记的羊抗鼠免疫球蛋白用含 1%OA 的 PBS 稀释 500 倍,每孔加 100

μl。37℃温育 60 min, PBS-T 洗板。每孔加 100 μl 底物(含 400 μmol·L⁻¹ ABTS, 0.009% H₂O₂ 的 45 mmol·L⁻¹ 柠檬酸钠缓冲液, pH 4.0)。显色 15 min 后, 加入 100 μl 终止液(300 mmol·L⁻¹ 柠檬酸, 15 mmol·L⁻¹ 叠氮钠)终止反应。在酶联免疫检测仪(Wellscan Mk2)上读数, 检测波长为 405 nm。

1.2.9 DON 浓度的计算

$$\text{DON 浓度 } (\mu\text{g}\cdot\text{g})^{-1} = C \times V \times (1/M) \times D$$

式中: C 表示酶标板上所测得的 DON 的浓度(μg·ml⁻¹), 根据标准曲线求得;

V 表示样品提取液的体积(ml);

M 表示样品质量(g);

D 表示稀释倍数。

2 结果与分析

2.1 抗体效价的测定

以未免疫 Balb/c 小鼠的血清作为阴性对照, 将经过免疫的豚鼠血清和 Balb/c 小鼠混合血清梯度稀释(1:100, 1:200, 1:400, 1:800, 1:1600, 1:3200, 1:6400, 1:12800, 1/25600, 1/51200)于 PBS 中后, 以 3-HS-DON-OVA 作为包被抗原, 包被浓度为 1/250, 对抗体效价进行间接 ELISA 检测。结果如图 1 所示, 阴性血清的平均 OD 值为 0.206, 以吸光值大于阴性血清吸光值 2 倍的孔所对应的最大抗体稀释度定为抗体效价, 豚鼠血清的效价为 1:6400, 小鼠混合血清的效价为 1:12800。

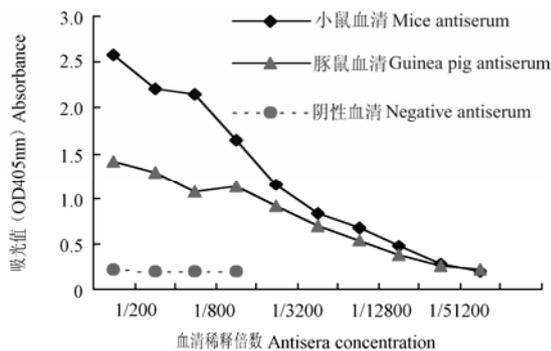


图 1 DON 抗血清间接 ELISA 效价测定

Fig. 1 Indirect ELISA titration of DON antiserum

2.2 抗体的特异性

镰刀菌属产生单端孢霉烯族毒素主要为 A 型毒素和 B 型毒素, 其中 A 型中最常见的是 T-2 毒素, 而 B

型中最常见的是 DON, 和 15-Ac-DON。因此, 选取 T-2、3-Ac-DON 和 15-Ac-DON 进行抗体的特异性研究。结果表明, 引起抗 DON 抗体最大结合 50%抑制时, 所需 DON 及其类似物 3-Ac-DON, 和 T-2 毒素的量分别为: 63 μg·ml⁻¹、114 μg·ml⁻¹ 和 >1 000 μg·ml⁻¹; 相对交叉反应率分别为 100%, 55.2% 和 <6.3%。另外, 1 μg·ml⁻¹ 的 15-Ac-DON 对 DON 的 ELISA 检测没有抑制。

表 1 包被原和血清工作浓度的测定

Table 1 Determination for optimal concentrations of coated antigen and antisera

Coated antigen concentration	Antisera concentration				
	1/400	1/800	1/1600	1/3200	1/6400
1/500	2.620	2.447	2.269	2.040	1.685
1/500	2.590	2.421	2.231	2.006	1.654
1/800	1.309	1.102	1.001	0.773	0.579
1/800	1.297	1.000	0.934	0.737	0.503
1/1000	1.187	1.093	0.964	0.770	0.513
1/1000	1.382	1.041	0.926	0.734	0.539
1/1500	1.448	1.222	1.059	0.884	0.629
1/1500	1.536	1.239	1.074	0.808	0.682
1/2000	1.508	1.210	1.124	0.900	0.648
1/2000	1.520	1.262	1.100	0.940	0.673

2.3 包被原和血清工作浓度的确定

分别将免疫的 Balb/c 小鼠和豚鼠的血清进行倍比稀释, 对不同浓度的包被抗原进行间接 ELISA 试验, 选择吸光值为 1.0 时的抗原抗体稀释浓度作为最适工作浓度。由表 1 可知, 包被抗原的最适工作浓度为 1/1500, 小鼠血清工作浓度为 1/1600。

2.4 有机溶剂对分析的影响

甲醇和水经常用于 DON 的提取, 为了明确甲醇是否会影响本研究中的抗原抗体反应, 在包被原和抗体的最适工作浓度下, 测定了不同浓度的甲醇对 DON 与其抗体反应的影响。结果表明(图 2), 10% 的甲醇对 DON 的免疫分析几乎没有影响, 而甲醇浓度超过 20% 以后, 对免疫反应的影响明显加大。

2.5 标准曲线

间接竞争 ELISA 测定了 DON 系列浓度的吸光值, 经过 CurveExpert 拟合, DON 在 0.001~1 000 μg·ml⁻¹ 的浓度范围内, 抑制率与浓度(LgC)之间符合曲线 $Y=0.3855+0.2075X+0.0097X^2+0.0088X^3$, 相关系数

0.9985。其中 DON 浓度在 $0.01 \sim 100 \mu\text{g}\cdot\text{ml}^{-1}$ 的范围内, 抑制率与浓度 (LgC) 之间具直线线性关系, 回归方程为 $Y = 0.4057 + 0.1771 X$, 相关系数 0.9915。以 10% 抑制率对应的浓度计算, 该方法对 DON 的检测限为 $0.02 \mu\text{g}\cdot\text{ml}^{-1}$ 。

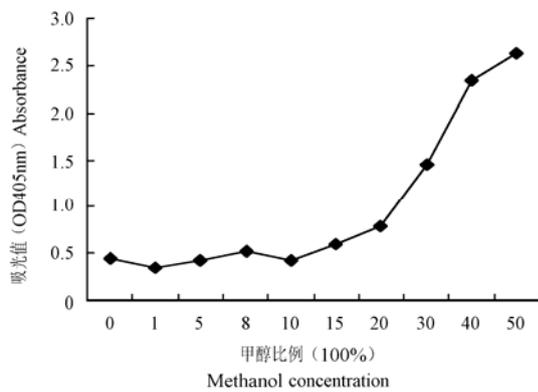


图 2 不同浓度的甲醇对分析的影响

Fig. 2 Effect of methanol concentration on the assay

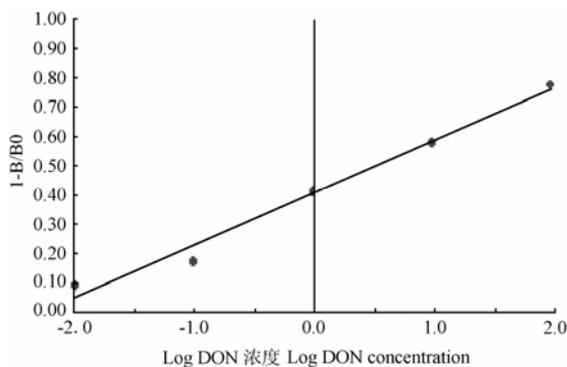


图 3 DON ELISA 免疫检测标准曲线

Fig. 3 The standard curve for DON ELISA

2.6 加标回收试验

为了测定 ELISA 方法对 DON 检测的准确度, 进行了 DON 的加标回收试验。于脱毒处理过的正常小麦样品中, 加入一定量的 DON 系列标准溶液。经提取后, 测得的回收结果见表 2。回收率为 82%~93%, 精密度 (CV%) 为 4.65%~21.3%。

2.7 样品中 DON 的含量检测

选择了四个对赤霉病抗病性显著不同的小麦品种的籽粒, 利用本方法测定了籽粒中的 DON 含量, 结果在 4 个样品中均检测到了较高含量的 DON。不同小

麦品种间的 DON 含量存在着较大的差异, 而 DON 的含量与小麦的抗赤霉病性呈相关性。感病品种的毒素含量远高于抗病品种。

表 2 小麦中 DON 的加标回收结果

Table 2 ELISA recovery of DON from artificially contaminated wheat sample

DON 添加浓度 Added DON ($\mu\text{g}\cdot\text{g}^{-1}$)	检测到的 DON DON detected ($\mu\text{g}\cdot\text{g}^{-1}$)	回收率 Recovery	精密度 CV
0.5	0.43 ± 0.02	86%	4.65%
10	9.3 ± 1.1	93%	11.8%
200	164 ± 35	82%	21.3%

表 3 不同小麦品种中 DON 的检测结果

Table 3 DON Detection in different FHB resistant wheat variety with ELISA

小麦品种 Wheat variety	抗赤霉病性 FHB Resistance	DON ($\mu\text{g}\cdot\text{g}^{-1}$)
苏麦 3 号 Sumai3	抗病 Resistant	3.98
望水白 Wangshuibai	抗病 Resistant	2.5
扬麦 158 Yangmai158	中抗 Middle	39.8
宁麦 6 号 Ningmai6	感病 Susceptible	63.1

3 讨论

3.1 乳化

为了减缓免疫原在动物机体内的释放速度, 延长免疫原具免疫活性的时间, 在免疫前必须将免疫原与佐剂乳化完全, 以形成油包水的结构。乳化方法主要有碾钵乳化和注射器乳化, 碾钵乳化操作简单, 效果较好, 但碾钵和碾棒上会粘附很多乳化的抗原, 约损失 60%~70%, 而且容易引起微生物污染^[18]。因此这种方法不适于 DON 等珍稀抗原的乳化。注射器乳化需要将两支注射器用塑料管对接起来来回推动, 这种方法如果顺利也经常需要两人花 2~3 h 的时间才能完成。当乳化到一定程度的时候, 推动的阻力会很大, 注射器对接的部位往往承受不住, 导致免疫原喷射而出, 从而前功尽弃。因此实验过程必须十分谨慎、细致。

3.2 免疫动物及免疫途径

为了得到高特异性、高效价的抗体, 除了要有良好的抗原外, 还需要选择合适的免疫动物及合理的免

疫途径。常用的免疫动物有家兔、豚鼠、大白鼠、绵羊、山羊、鸡和小白鼠等。本研究的免疫动物为 Balb/c 小鼠和豚鼠, 多次免疫均获得了抗 DON 的血清, 但是小鼠产生的血清效价要远远高于豚鼠产生的血清, 这是动物种间差异引起还是免疫途径不同引起, 尚有待于进一步研究。

陈新建等^[19]认为半抗原-蛋白质连接物进行免疫的较好途径是背部多点皮内注射。本研究采用多点皮内注射法免疫豚鼠, 每次免疫后免疫部位都会出现大片溃烂, 这可能影响了抗体的产生。另外笔者认为小鼠采用多点皮内注射不易操作, 而采用腹腔内注射较方便, 但必须注意注射深度不能超过 5 mm。

3.3 交叉反应与特异性

本研究制备的抗体与单端孢霉烯族类 A 型化合物 T-2 的交叉反应很弱, A 型化合物的存在将不会影响到 DON 的 ELISA 检测。3-Ac-DON 与抗体的交叉反应率则比较高, 对于 3-Ac-DON 浓度较高的试样, 则最终检测到的 DON 浓度就会高于实际浓度。但谷物中 3-Ac-DON 的含量往往非常低^[1,2], 因此应不足以影响到 DON 的检测。另外, 本研究发现 $1 \mu\text{g}\cdot\text{ml}^{-1}$ 的 15-Ac-DON 对 DON 的 ELISA 没有影响。有报道指出, 3-HS-DON-BSA 的抗体往往与 3-Ac-DON 有较强的交叉反应, 而与 15-Ac-DON 的交叉反应则很弱, 而 3-HS-DON-HAS 制备的抗体与 3-Ac-DON 和 15-Ac-DON 均无交叉反应^[17, 20]。这说明同一抗原可能刺激机体产生针对不同的抗原决定簇的抗体。

3.4 DON 的提取

样品的提取和预处理要尽可能简单。含水的溶剂易于渗透到亲水的组织中, 而促进毒素的溶出。水的合适比例能进一步增强溶剂中毒素的含量^[21], 笔者认为采用甲醇-水 (1:9) 提取小麦样品中的 DON 可以得到满意的效果。

与毒素共存于谷物中的脂类和蛋白可能通过影响酶的反应或毒素与抗体的结合来削弱 ELISA 过程^[14,16,20]。Pestka 等^[22]发现由 2.5 mg 小麦基质得来的一份检测样品提取物, 不经过净化, 对 T-2 的免疫检测没有干扰, 而高于 2.5 mg 就会有所影响, 达到 25 mg 时, 会引起显著的干扰。在本研究中, 我们没有发现基质效应, 不需要对提取液进行净化, 也不需要浓缩。

3.5 甲醇浓度与显色效果

本研究发现, 甲醇的浓度超过 20% 会显著影响显

色效果。这与 Barna-Vetro^[14]的研究结果类似。笔者通过减少甲醇的浓度至 15% 以下, 有效地避免了甲醇对显色的不良影响。

4 结论

本研究利用 3-HS-DON-BSA 作免疫原, 采用多种注射免疫法免疫 Balb/c 小鼠和豚鼠, 获得了高效价的 DON 多抗血清, 包被抗原的最适工作浓度为 1/1 500, 小鼠血清工作浓度为 1/1 600。在包被原和小鼠血清的最适工作浓度下, 甲醇稀释度对 DON 免疫分析有不同程度的影响, 低于 15% 浓度的甲醇对 DON 免疫分析的影响很小, 浓度在 20% 以上时, 则会有显著的影响。建立的间接 ELISA 法检测方法, 对 3-AC-DON 和 T-2 的相对交叉反应率分别为 55.2% 和 6.3%, 检测范围为 $0.01 \sim 100 \mu\text{g}\cdot\text{ml}^{-1}$, 平均回收率为 82%~93%, 精密度 (CV%) 为 4.65%~21.3%。应用本文建立的方法, 对小麦籽粒中的 DON 含量进行了测定, 发现对赤霉病抗性不同的小麦品种, 其籽粒的毒素含量与品种的感病程度一致。

References

- [1] 王裕中, 米 勒. 中国小麦赤霉病菌优势种——禾谷镰刀菌产毒素能力的研究. 真菌学报, 1994, 13: 229-234.
Wang Y Z, Miller J D. Toxin producing potential of *Fusarium graminearum* from China. *Acta Mycologica Sinica*, 1994, 13(3): 229-234. (in Chinese)
- [2] Bottalico A, Perrone G. Toxigenic *Fusarium* species and mycotoxins associated with head blight in small-grain cereals in Europe. *European Journal of Plant Pathology*, 2002, 108: 611-24.
- [3] 史建荣, 王裕中, 何晨阳, 王金生. 镰刀菌单端孢霉烯毒素及其在植物病程中的作用. 植物病理学报, 1997, 27: 298-302.
Shi J R, Wang Y Z, He C Y, Wang J S. *Fusarium trichothecene* toxins and their function in plant disease. *Chinese Journal of phytopathology*, 1997, 27: 298-304. (in Chinese)
- [4] Dyer R B, Plattner R D, Kendra D F, Brown D W. *Fusarium graminearum* TRI14 is required for high virulence and DON production on wheat but not for DON synthesis in vitro. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 2005, 53: 9281-9287.
- [5] Pestka J J, Zhou H R, Moon Y, Chung Y J. Cellular and molecular mechanisms for immune modulation by deoxynivalenol and other trichothecenes: unraveling a paradox. *Toxicology Letters*, 2004, 153: 61-73.

- [6] Schollenberger M, Muller HM, Ruffle M, Suchy S, Planck S, Drochner W. Survey of fusarium toxins in foodstuffs of plant origin marketed in Germany. *International Journal of Food Microbiology*, 2005, 97: 317-326.
- [7] Arnold D L. The toxicity of orally administered deoxynivalenol (vomitoxin) in rats and mice. *Food and Chemical Toxicology*, 1986, 24: 935-941.
- [8] McMullen M, Jones R, Gallenberg D. Scab of wheat and barley: a re-emerging disease of devastating impact. *Plant Disease*, 1997, 81: 1340-1348.
- [9] Scott P M, Kanhere S R. Comparison of column phases for separation of derivatized trichothecenes by capillary gas chromatography. *Journal of Chromatography*, 1986, 368: 374-380.
- [10] Tacke B K, Casper H H. Determination of deoxynivalenol in wheat, barley, and malt by volumn vleanup and gas chromatography with electron capture detection. *Journal of AOAC International*, 1996, 79: 472-475.
- [11] Trucksess W M, Page S W, Wood G E, Cho T H. Determination of deoxynivalenol in white flour, whole wheat flour, and bran by solid-phase extraction/liquid chromatography: interlaboratory study. *Journal Of AOAC International*, 1998, 81: 880-886.
- [12] Jestoi M, Ritieni A, Rizzo A. Analysis of the fusarium mycotoxins fusaproliferin and trichothecenes in grains using gas chromatography-mass spectrometry. *Journal of Agriculture and Food Chemistry*, 2004, 52: 1464-1469.
- [13] Klotzel M, Gutsche B, Lauber U, Humpf H U. Determination of 12 type A and B trichothecenes in cereals by liquid chromatography-electrospray ionization tandem mass spectrometry. *Journal of Agriculture and Food Chemistry*, 2005, 53: 8904-8910.
- [14] Barna-Vetro I, Gyongyosi A, Solt L. Monoclonal antibody-based enzyme-linked immunosorbent assay of Fusarium T-2 and zearalenone toxins in cereals. *Applied and Environmental Microbiology*, 1994, 60: 729-731.
- [15] Casale W L, Pestka J J, Hart L P. Enzyme-linked immunosorbent assay employing monoclonal antibody dpecific for deoxynivalenol (Vomitoxin) and several analogues. *Journal of Agriculture and Food Chemistry*, 1988, 36: 663-668.
- [16] Laamanen I, Veijalainen P. Factors affecting the results of T-2 mycotoxin ELISA assay. *Food Additives Contaminants*, 1992, 9: 337-343.
- [17] Park J J, Chu F S. Assessment of immunochemical methods for the analysis of trichothecene mycotoxins in naturally occurring moldy corn. *Journal of AOAC International*, 1996, 79: 465-471.
- [18] 杨利国, 胡少昶, 魏平华, 郭爱珍. 酶免疫测定技术. 南京: 南京大学出版社, 1998:279-284.
- Yang L G, Hu S C, Wei P H, Guo A Z. *Technology of Immunoassay*. Nanjing: Nanjing University Press, 1998, 279-284. (in Chinese)
- [19] 陈新建, 陈梅英, 赵会杰. 免疫学技术在植物科学中的应用. 北京: 中国农业大学出版社, 1998.
- Chen X J, Chen M Y, Zhao Y J. *Application of Immunological Techniques in Plant Science*. Beijing: China Agricultural University Press, 1998. (in Chinese)
- [20] Wei R D, Chu F S. Production and characterization of a generic antibody against group A trichothecenes. *Analytical Biochemistry*, 1987, 160: 399-408.
- [21] Smith J E, Lewis C W, Anderson J G, Solomons G L. Mycotoxins, occurrence and toxicity. In: *Mycotoxins in Human Nutrition and Health*. Science Research Development, European Commission. Brussels. 1994:2-80.
- [22] Pestka J J, Lee S C, Lau H P, Chu F S. Enzyme-linked immunosorbent-assay for T-2 toxin. *Journal of the American Oil Chemists Society*, 1981, 58: 940-944.

(责任编辑 王红艳)