

实验技术与方法

食品中苏丹红 I 间接竞争 ELISA 方法的研究

党荣理¹ 任立松¹ 柳增善² 郭红³

(1. 新疆军区疾病预防控制中心,新疆 乌鲁木齐 830011; 2. 吉林大学人兽共患病研究所,吉林 长春 130062; 3. 兰州军区乌鲁木齐总医院,新疆 乌鲁木齐 830000)

摘要:目的 建立食品中苏丹红 I 免疫学检测方法。方法 本室自制获得单克隆抗体,优化反应条件,初步建立检测苏丹红 I 的间接竞争 ELISA 方法,确定抗原包被浓度为 1.00 μg/ml,包被温度为 4℃ 过夜 37℃ 1 h,单抗稀释倍数为 1:3 200,底物作用时间 15 min。结果 检测方法的回归方程和相关系数为: $y = -38.541x + 131.1$, $r = 0.9841$;线性范围为 0.053 ~ 0.92 μg/L,最低检测浓度为 0.018 μg/L,平均回收率为 84.72%。结论 该方法能够检测样品中苏丹红 I,具有检测限低、耗时短、成本低的特点,有一定的应用前景。

关键词:苏丹红 I; 单克隆抗体; 酶联免疫吸附反应; 检测

中图分类号:R155.5 文献标识码:A 文章编号:1004-8456(2010)04-0336-04

Rapid ELISA for the Detection of Sudan I in Foods

DANG Rong-li, REN Li-song, LIU Zeng-shan, GUO Hong

(Xinjiang Command Center for Disease Control and Prevention, Xinjiang Urumqi 830011, China)

Abstract: Objective To prepare a rapid immunological assay for detecting Sudan I in foods. **Method** Optimizing the reaction conditions for anti-Sudan I monoclonal antibody prepared in lab and establishing a competitive inhibition ELISA method for detecting Sudan I. It is defined in the study that the optimal concentration of coating antigen was 1.00 μg/ml, the optimal dilution of the monoclonal antibody was 1: 3 200 and the optimal action time with substrate was 15 min. **Results** The regression equations of the detection method was $y = -38.541x + 131.1$ and the correlation coefficients (r) was 0.984 1. The detectable limit was in the range of 0.053-0.92 μg/L. The average recovery was 84.72%. **Conclusion** The benefit of this method for Sudan I is detectable in micro amount, friendly in use, relatively inexpensive and saving time.

Key words: Sudan I; Monoclonal Antibody (McAb); ELISA; Detection

由于苏丹红 I 食用后在相应酶的作用下,在体内产生致癌物质,对人体具有较为严重的危害,因此,中国及欧盟严禁在食品中添加苏丹红 I。但在不法利益的驱动下,仍有一些食品生产企业在食品中添加苏丹红 I。自 2005 年以来,已经发生了多起在食品中添加苏丹红 I 的事件,其危害和影响都较为严重,日益引起人们的关注。本研究通过本室自制的苏丹红 I 单克隆抗体,优化 ELISA 检测条件,对苏丹红 I 免疫学检测方法进行了探索。

1 材料与方法

1.1 仪器及试剂

倒置显微镜(OLYMPUS 公司),酶联免疫检测

仪、50 ml 细胞培养瓶及 96 孔可拆卸酶标板(NUNC 公司)。

苏丹红 I 单克隆抗体(Su-McAb)、苏丹红 I 结构类似物与牛血清白蛋白偶联物(ASu-BSA)^[1],苏丹红 I、II、III、IV、甲基红、酚红标准品(上海生工,纯度 >95%);辣根过氧化物酶(Sigma 公司);辣根过氧化物酶标记羊抗鼠 IgG(鼎国生物技术有限公司);乙腈(Fisher 公司,色谱纯)。

洗涤液为磷酸盐吐温缓冲液:氯化钠(NaCl) 8.0 g、磷酸氢二钾(K₂HPO₄) 0.2 g、12 水磷酸氢二钠(Na₂HPO₄·12H₂O) 2.9 g、氯化钾(KCl) 0.2 g、吐温-20 0.5 ml(以上试剂均购自天津福晨化学试剂厂,分析纯),加蒸馏水定容至 1 000 ml。

苏丹红 I 储备液:用乙腈将苏丹红 I 标准品稀释成 50 mg/L。

1.2 苏丹红 I 竞争抑制 ELISA 最佳工作条件确定
按朱立平^[2]介绍的方法设计 ELISA 操作流程,

收稿日期:2009-11-02

作者简介:党荣理 男 主任医师 研究方向为预防医学

E-mail:dz4343@sina.com

每个步骤之间均用洗涤液洗涤 3 次,每次洗 3 min,每种试剂加入的体积均为 100 μl 。以 ASu-BSA 为包被抗原,Su-McAb 为阳性血清,取未进行苏丹红 I 免疫的 BALB/c 鼠血清作为阴性血清^[1]。在 A 值接近 1.0 时,以 $P/N(A_{\text{阳性}}/A_{\text{阴性}})$ 值在 2.0 以上并呈现最大者的反应条件作为确定 ELISA 最佳反应条件的判定依据。

1.2.1 抗原最佳包被浓度的选择 采用方阵滴定法,将抗原 ASu-BSA 用包被液分别稀释成 2.0、1.0、0.5 和 0.25 $\mu\text{g}/\text{ml}$ 包被。阴性血清、Su-McAb 分别作 1:400、1:800、1:1600、1:3200、1:6400、1:12800 倍稀释。

1.2.2 抗原最佳包被条件的选择 以抗原最佳包被浓度包被反应板,按 37 $^{\circ}\text{C}$ 1 h、37 $^{\circ}\text{C}$ 2 h、4 $^{\circ}\text{C}$ 过夜、4 $^{\circ}\text{C}$ 过夜 37 $^{\circ}\text{C}$ 1 h 4 种条件分别包被(过夜时间约为 12 h),阴性血清、Su-McAb 1:3200 稀释。

1.2.3 酶标二抗最佳工作浓度的选择 将辣根过氧化物酶标记羊抗鼠 IgG 分别作 1:1000、1:2000、1:3000、1:4000、1:5000 倍稀释。

1.2.4 封闭剂、血清和酶标二抗最佳作用时间的选择 用 1% 牛血清白蛋白作为封闭剂,阴性血清、Su-McAb 和酶标二抗的作用时间分别设为 5、10、15、20、25 min。

1.3 苏丹红 I ELISA 检测标准工作曲线

苏丹红 I 储备液用磷酸盐缓冲液(PBS pH 7.0)稀释成不同浓度的标准液(100、50、25、12.5、6.25、3.125、1.56、0.78、0.39、0.2、0.1 $\mu\text{g}/\text{L}$),将 Su-McAb 稀释至不同浓度,用竞争 ELISA 法检测获得不同浓度下的 A_{490} 值,以抑制率($P/N\%$)值为纵坐标,以 $\lg(10 \times \text{苏丹红 I 浓度})$ 为横坐标绘制标准工作曲线。

1.4 样品模拟提取及回收

参考苏丹红 I 国家检测标准样品处理方法^[3],略作改进。用一定量的苏丹红 I 储备液喷洒于辣椒面中,称取 1 g(准确至 0.01 g)辣椒于三角瓶中,加入 10 ml 正己烷,超声 5 min,过滤,用 10 ml 正己烷洗涤残渣数次,至洗出液无色,合并正己烷液,用旋转蒸发仪浓缩至 5 ml 以下,用含 5% 丙酮的正己烷液 60 ml 洗脱,收集、浓缩后,用丙酮转移并定容至 5 ml,经 0.45 μm 有机滤膜过滤后待测。用建立的间接竞争 ELISA 法检测,苏丹红 I 的实际含量($\mu\text{g}/\text{L}$)可根据酶标板上测得 A_{490} 后由标准曲线求得 $\lg(10 \times \text{苏丹红 I 浓度})$,再通过反对数求得;苏丹红 I 的理论含量按公式 1 计算:

$$C = mv/VL \quad (1)$$

注:C 为苏丹红 I 浓度, $\mu\text{g}/\text{L}$; m 为添加苏丹红

I 的实际量, μg ; v 为实际提取的样品体积,ml; V 为样品提取液的初始体积,ml; L 为吹干后样品的溶解体积,ml。

1.5 方法特异性实验

制备苏丹红 II、苏丹红 III、苏丹红 IV、甲基红、酚红溶液,稀释浓度至 1.0 $\mu\text{g}/\text{ml}$,作为竞争物,利用建立的 ELISA 方法检测,确定该方法的特异性。

2 结果

2.1 苏丹红 I 竞争 ELISA 最佳工作条件确定

2.1.1 抗原最佳包被条件确定 包被抗原 ASu-BSA 以 2.0、1.0、0.50、0.25 $\mu\text{g}/\text{ml}$ 在不同温度下包被酶标板,抗体以 $0.4 \times 10^4 \sim 1.28 \times 10^4$ 倍比稀释,测定 A_{490} 值,选敏感范围在 1.0 左右,确定抗原抗体最佳工作浓度。结果显示最佳抗原包被浓度为 1.0 $\mu\text{g}/\text{ml}$,最佳抗体稀释度为 1:3200(见表 1),最佳包被温度为 4 $^{\circ}\text{C}$ 过夜 37 $^{\circ}\text{C}$ 1 h(见图 1)。

2.1.2 酶标二抗最佳作用浓度、底物作用时间确定

酶标二抗分别作 $0.1 \times 10^4 \sim 0.5 \times 10^4$ 梯度稀释,其他反应条件不变,其 $A_{\text{阳性}}$ 分别为 0.894、0.898、0.909、0.917、0.860, $A_{\text{阴性}}$ 值分别为 0.117、0.111、0.098、0.104、0.124,酶标二抗浓度为 1:4000 时, $A_{\text{阳性}}/A_{\text{阴性}}$ 值最大。底物作用时间 15 min(见表 2)。

表 1 抗原抗体最佳工作浓度确定

ASu-BSA ($\mu\text{g}/\text{ml}$)	抗体稀释倍数($\times 1000$)					
	1:0.4	1:0.8	1:1.6	1:3.2	1:6.4	1:12.8
2.00	0.885	0.816	0.902	0.903	0.856	0.842
1.00	0.871	0.872	0.891	0.983	0.827	0.823
0.50	0.713	0.729	0.817	0.822	0.833	0.746
0.25	0.701	0.725	0.831	0.814	0.729	0.803

表 2 底物作用时间选择

A 值	作用时间(min)				
	5	10	15	20	25
阳性	0.745	0.836	0.802	0.718	0.725
阴性	0.124	0.111	0.085	0.098	0.112

2.1.3 确立苏丹红 I 间接竞争 ELISA 检测条件

包被抗原用 pH9.6 的磷酸盐缓冲液稀释至 1.0 $\mu\text{g}/\text{ml}$,每孔 100 μl 包被 96 孔酶标板,4 $^{\circ}\text{C}$ 过夜 37 $^{\circ}\text{C}$ 1 h;用洗液洗板 3 次,每次 3 min;加入苏丹红 I 标准品或待检样品与相同体积 Su-McAb(1:3200)各 50 μl ,37 $^{\circ}\text{C}$ 板内竞争反应 30 min;洗板 3 次;酶标羊抗小鼠 IgG(1:4000),每孔 100 μl ,37 $^{\circ}\text{C}$,30 min,洗板 3 次;加邻苯二胺(OPD)显色

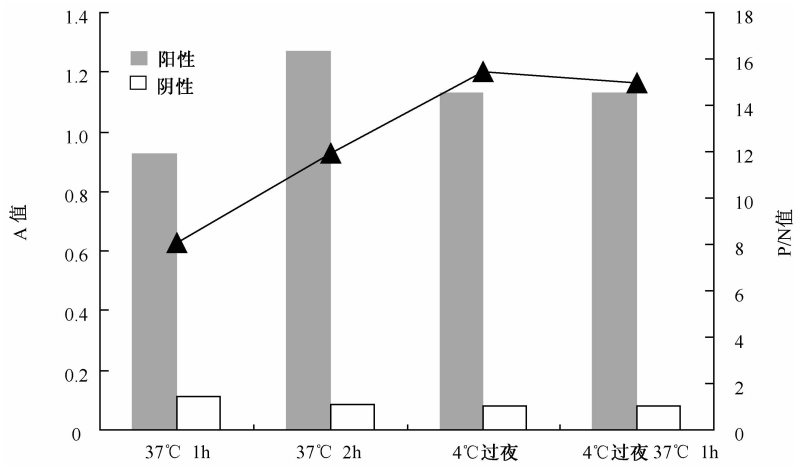


图1 抗原包被时间选择

液,每孔 100 μl, 37 °C, 15 min; 加入终止液, 每孔 50 μl, 酶联免疫检测仪测定 490 nm 处吸光度值。

2.2 标准工作曲线

将苏丹红 I 贮存液用磷酸盐缓冲液 (PBS pH

7.0) 稀释成不同浓度的标准液, 将 Su-McAb 稀释至 1:3 200, 间接竞争 ELISA 法检测获得 A_{490} 值并绘制标准工作曲线 (见图 2)。检测方法的回归方程和关系系数为 $y = -38.541x + 131.1, r = 0.9841$ 。

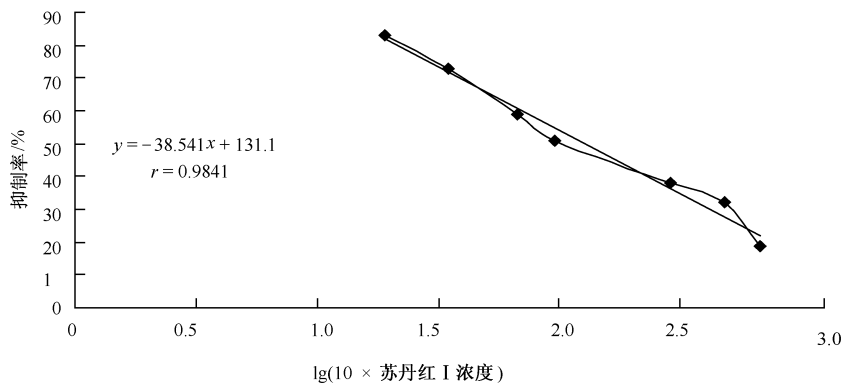


图2 间接竞争 ELISA 工作曲线

2.3 线性范围和检出限

线性范围为 0.053 ~ 0.92 μg/L, 经对苏丹红 I 倍比稀释后, 用该方法检测, 最低检出浓度为 0.018 μg/L。

2.4 苏丹红 I 加标回收试验

在苏丹红 I 阴性的辣椒样品中加入一定量的苏丹红 I 标准溶液, 提取后用本文建立的方法检测, 结果见表 3, 回收率为 84.72%。

表3 辣椒样品的加标回收试验结果

添加苏丹红 I 标准品 (ng)	项 目						
	提取辣椒 样品重 (g)	样品终 体积 (ml)	理论值 (ng/ml)	A 值	测定值 (ng)	回收率 (%)	平均回收率 (%)
50.00	10	10	5	0.701	43.20	86.40	
100.00	10	10	10	0.586	82.91	82.91	84.72
500.00	10	10	50	0.298	424.28	84.86	

2.5 特异性实验

与苏丹红 I 结构相近的苏丹红 II、苏丹红 III、苏丹红 IV, 以及与其颜色相近的甲基红、酚红为竞争物, 按照该方法进行 ELISA 检测, 结果发现未发生交叉反应, 说明该方法具有较好的特异性。

3 讨论

目前苏丹红 I 检测的研究主要集中在仪器检测方面, 如高效液相色谱^[4]、反相液相色谱^[5]、气相色谱质谱法^[6]、液相色谱电喷雾离子法^[7]、极谱法^[8]等, 这与传统检测观念认为小分子物质检测

常用仪器方法有关。在小分子物质尤其是偶氮染料检测方面,分子量小、吸收波、分子离子峰特征明显,用仪器检测具有一定优势。在苏丹红系列色素检测上,可以同时检测苏丹红 I、II、III、IV 做出定性定量检测。但仪器检测也有不足之处:仪器昂贵、操作繁琐、耗时长、费用高,这些与人们对食品检测快速、简捷、价廉的要求还有差距,在一定程度上限制了仪器检测。

由于单克隆抗体技术的发展,使小分子物质用免疫学检测方法检测成为可能,在本实验的研究中,就是利用苏丹红 I 分子结构的特点,通过杂交瘤技术制备单克隆抗体,优化反应条件,从而建立间接竞争 ELISA 检测方法。该方法对仪器要求不高,并且具有操作简单、费用低、耗时短等特点,但在实际应用中仍有不足之处,与苏丹红 I 的分子特性^[9]有关,苏丹红 I 分子结构为偶氮化合物,在分子结构中羟基(-OH)与双偶氮双键相邻,使其分子结构异常稳固,具极强的疏水性,且易吸附于酶标板孔壁。在检测过程中,当待测物中苏丹红 I 含量较高时,大量苏丹红 I 分子吸附于酶标板孔壁上,从而影响酶联免疫检测仪读数的准确性。因此,该方法适用于食品中微量的苏丹红 I 的快速检测。在实际检测过

程中,当将待测样品加至酶标板孔后,如发现孔壁上有红色附着,且在洗板过程中,难以洗下,可初步判断样品中苏丹红 I 含量过高,需要将样品进行适当稀释后,再进行检测,可以得到样品中苏丹红 I 的准确含量。

参考文献

- [1] 任立松,王颖,党荣理,等. 苏丹红 I 单克隆抗体的制备与鉴定[J]. 中国卫生检验,2008,18(2):201-203.
- [2] 朱立平. 免疫学常用实验方法[M]. 北京:人民军医出版社,2000:352-356.
- [3] GB/T 19681—2005 食品中苏丹红染料的检测方法[S]. 北京:中国标准出版社,2006.
- [4] 张裕平,张毅军,袁倬斌,等. 高效液相色谱法测定红辣椒制品中的苏丹红[J]. 生命科学仪器,2005,3(3):25-28.
- [5] 李军,雍炜,李刚,等. HPLC 法测定辣椒及其制品中的苏丹红色素含量[J]. 检验检疫科学,2005,15(2):43-45.
- [6] 黄晓兰,吴惠勤,黄芳,等. GC-MS/SIM 法同时测定食品中的苏丹红 I-IV[J]. 分析测试学报,2005,24(4):1-5.
- [7] 喻凌寒,杨运云,闫世平,等. LC-ESI/MS 分析食品中微量苏丹红 I ~ IV[J]. 分析测试学报,2005,24(4):28-31.
- [8] 彭科怀,向仕学,汤晓勤,等. 辣椒制品中苏丹红 I 的极谱法快速测定[J]. 预防医学情报杂志,2005,21(3):286-288.
- [9] 何汉文,陈熙东. 精细有机化学品生产工艺手册[M]. 北京:化学工业出版社,2003:590.

公告栏

中华人民共和国卫生部公告

2010 年 第 4 号

根据《中华人民共和国食品安全法》规定,经审核,现批准富马酸一钠等 4 种物质为食品添加剂,批准瓜尔胶等 20 种食品添加剂和食品营养强化剂左旋肉碱扩大使用范围及使用量,批准留兰香等 30 种物质为食品用香料。

特此公告。

- 附件:1. 食品添加剂新品种(略)
2. 扩大使用范围及使用量的食品添加剂(略)
 3. 扩大使用范围及使用量的食品营养强化剂(略)
 4. 食品用香料新品种(略)

二〇一〇年三月十六日