

东北地区水稻、小麦和玉米镰孢菌鉴定与ZEN毒素检测

张铉哲, 韩晓旭, 郭衍锦, 李璐

(东北农业大学, 哈尔滨 150030)

摘要:在黑龙江、吉林和辽宁三省的13个市县,水稻、小麦和玉米的主要产区共分离到214株镰孢菌株,其中分离频率最高的是禾谷镰孢菌(58.1%)。镰孢菌株产生玉米赤霉烯酮(ZEN),具有较强生物毒性,对人畜有很强的毒害作用,因此检测作物中玉米赤霉烯酮含量是十分必要的。单克隆抗体进行特异性分析结果显示,抗-ZEN单克隆抗体与ZEN、 α -玉米赤霉醇、 β -玉米赤霉醇和 β -玉米赤霉烯醇结合率分别为100%、188.7%、43.9%和25.6%,而与脱氧雪腐镰刀菌烯醇和黄曲霉毒素的结合率则均小于1.0%,由此证明试验制备的单克隆抗体具有较高特异性。以该单抗为依据建立的ELISA检测法,检测限为0.4 ng/mL,检测区间为0.4~25.00 ng/mL,曲线回归方程 $y=-0.7673x+3.1318$,与相似毒素的交叉反应率均小于1.0%,回收率在79%~112%之间。用ELISA产毒能范围在0.27~1.61 μ g/L,其中有6株禾谷镰孢菌(*Fusarium graminearum*)菌株具有产毒能力。研究结果说明建立的间接竞争ELISA方法可以用于检测玉米赤霉烯酮。

关键词:镰孢菌属;玉米赤霉烯酮;玉米赤霉烯酮单克隆抗体;ELISA

中图分类号:S432.4

文献标识码:A

文章编号:1003-8701(2018)01-0016-08

Identification of *Fusarium* spp. Isolated in Northeastern China and Detection of ZEN Toxin

ZHANG Xuanzhe, HAN Xiaoxu, GUO Yanjin, LI Lu

(Northeast Agricultural University, Harbin 150030, China)

Abstract: 214 strains of *Fusarium* spp. were isolated in 13 cities and counties of the main producing areas of rice, wheat and maize in Heilongjiang, Jilin and Liaoning provinces. Of which, the highest isolation frequency was *Fusarium graminearum* (58.1%). *Fusarium* spp. produces zearalenone (ZEN), which has a strong biological toxicity and makes a strong poisoning effect to humans and animals. Therefore, the detection of zearalenone content in crops is very necessary. In this paper, ZEN-BSA conjugated to bovine serum albumin (ZEN-BSA) was used as antigen to immunize mice. The results of specific analysis for monoclonal antibodies showed that the binding rates of anti-ZEN monoclonal antibody to ZEN, α -zearanol, β -zearanol and β -zearalenol were 100%, 188.7%, 43.9% and 25.6%, respectively. And the binding rate to deoxynivalenol and aflatoxin was less than 1.0%, which proved that the monoclonal antibody prepared by the experiment had higher specificity. The monoclonal antibody was prepared for ELISA detection method based on the model, the detection limit is 0.4 ng/mL, the detection range of 0.4-25.00 ng/mL, the curve regression equation is $y=-0.7673x+3.1318$, and the cross reaction of similar toxins were less than 1%, the recovery was 79%-112%. The range of toxin production with ELISA was 0.27-1.61 μ g/L. There were 6 strains of *Fusarium graminearum* toxin producing strains with ability. The results showed that the indirect competitive ELISA method can be used for the detection of zearalenone.

Key words: *Fusarium*; Zearalenone; Anti-ZEN mAb; ELISA

收稿日期:2017-10-06

基金项目:黑龙江省自然科学基金(C2016019);黑龙江省马铃薯现代农业产业技术协同创新体系(HNWJZTX201701)

作者简介:张铉哲(1970-),男,教授,博士,研究方向为植物病害综合防治。

玉米穗腐病是一种世界性的真菌病害,主要发生在玉米生长中后期。穗腐病在全世界各玉米生产地区均有发生,因此,国内外对玉米穗粒腐病菌展开了大量的研究。1946年ULLSTRUP在美国首次报道引起玉米灰色穗腐的主要病原菌是玉蜀黍葡萄座腔菌(*Botryosphaeria zeae*)^[1]。在欧洲HA Makun等报道称镰孢菌(*Fusarium* spp.)、黄曲霉(*Aspergillus flavus*)等是引发玉米穗粒腐病的主要病原菌^[2]。近年来,国内外大量研究表明,在许多国家和地区,镰孢菌属(*Fusarium* spp.)是玉米穗腐病的主要致病菌^[3]。任金平等^[4]报道,在吉林省共分离出13个属19个种的致病菌,其中分离频率最高的为串珠镰孢(*Fusarium moniliforme*),为53.4%,其次为串珠镰孢胶孢变种(*Fusarium moniliforme oxysporum*)占15.4%,禾谷镰孢(*Fusarium graminearum*)占12.6%。

随着人们食品安全意识的逐步提高,真菌毒素的危害也逐渐被认知。镰孢菌毒素是一种重要的真菌毒素,早在20世纪80年代,我国就有关于镰孢菌毒素危害报道。镰孢菌毒素是镰孢菌的次生代谢产物,它的毒性很强。污染范围广泛,尤其是对食品、饲料作物和农作物,会导致产品品质降低^[5]。同时,镰孢菌毒素还会抑制人和动物体内DNA、RNA、蛋白质以及酶类的合成,并破坏细胞结构,导致人和动物毒素中毒,使人与动物的食品安全受到巨大威胁^[6]。镰孢菌分泌产生的真菌毒素有很多种,其中对人类危害最大的主要是玉米赤霉烯酮、伏马菌素等,这几种毒素是食品与饲料中最普遍存在的镰孢菌毒素,与人类与家畜健康密切相关^[7]。玉米赤霉烯酮(Zearalenone, ZEN)又称F-2毒素,最初是由Stob等人从被镰孢菌污染的发霉玉米中分离得到。玉米赤霉烯酮具有较强的生殖发育毒性和致癌作用,Stopa等^[8]研究了玉米赤霉烯酮对犬类子宫的影响,发现ZEN含量为75 μ g/kg时,犬类子宫会出现内膜腺体增生的现象。饲料中ZEN含量为1 mg/kg时,动物会有雌性化现象,浓度更高就会导致动物流产。ZEN不仅对家畜有生殖影响,同样对人也有很强的生殖毒害作用。ZEN可以导致儿童青春期提前,儿童发育早熟^[9],且污染范围广泛。Plcinta等^[10]调查二十多个国家的谷物原料情况,在大多数国家的谷物原料中都能发现ZEN的污染。李荣涛等^[11]检测采集自全国近50个地区中的48份小麦样本与33份玉米样本,得出的检出率均高达100%,检测浓度为0.014~0.47 mg/kg、0.018~

0.73 mg/kg。因此,建立一种快速、灵敏度高、准确的检测玉米赤霉烯酮毒素的方法具有重要研究意义。

因ZEN广泛地污染谷物,对人畜毒害作用强,各国先后建立薄层层析法(TLC)、高效液相色谱法(HPLC)、气相色谱法(GC)和免疫学检测方法等多种ZEN毒素检测方法。免疫学检测方法广泛应用于检测真菌毒素。1971年Engvall和Perlmann^[12]报道将免疫技术发展检测体液中微量物质的固相免疫测定方法,即酶联免疫吸附测定法(Enzyme-Linked ImmunoSorbent Assay, ELISA)。ELISA检测法具有特异性强、灵敏度高、样品无需进行前处理、无需价格高昂设备和操作简便易于推广等优点,因此适用于检测大批量样品中真菌毒素含量。目前,该法已广泛应用于食品、农产品、饲料和肉类等多个领域的真菌毒素检测中。多个国家的检测标准中也包括此法,我国国家标准《食品中黄曲霉毒素B1的测定》(GB/T 5009.22—2003)也包含该法。以ELISA检测法为依据,国内外研制多种用于检测真菌毒素酶联免疫吸附法试剂盒,也已被广泛用于毒素检测工作中,检测限可达1 ng/kg,能符合欧盟的检测要求。但酶联免疫吸附法也存在一些缺点,如该方法特异性较强,所以只能应用于对单一毒素的检测;有时该方法存在假阳性现象,无法准确确定结果;该法虽然检测时方便易行,但单克隆抗体制备技术难度大。

本文旨在筛选出特异性强的单克隆抗体,在此基础上建立特异性强且灵敏度高的(ELISA)检测法;最后应用(ELISA)检测法测定分离镰孢菌中玉米赤霉烯酮毒素含量,明确东北三省谷物主产区玉米赤霉烯酮(Zearalenone)污染状况。本研究进一步完善真菌毒素检测技术体系,又可为水稻、小麦和玉米主产区病害发生情况测报、防治提供依据。

1 材料与方 法

1.1 试验材料

1.1.1 采集病样

在黑龙江、吉林和辽宁三省的13个市县,水稻、小麦和玉米的主要产区,采集玉米穗腐病样12份,水稻穗腐病样9份,小麦赤霉病样7份,共28份(采集病样时用剪刀剪下发病穗部,分别收集到取样袋中)。

1.1.2 试验动物和细胞

Sp2/0骨髓瘤细胞由中国农业科学院哈尔滨兽医研究所馈赠;Balb/C小鼠购自北京通利华实验动物科技有限公司,重量为18~20 g,7~8周龄,雌性。

1.1.3 主要试剂

玉米赤霉烯酮(ZEN)、HRP标记的羊抗鼠IgG、牛血清白蛋白(BSA)、卵白蛋白(OVA)、脱脂奶粉均购自上海生物工程有限公司;弗氏完全佐剂、弗氏不完全佐剂均购自上海生物工程有限公司。

1.1.4 主要仪器

CO₂恒温培养箱、酶标仪(Labsystem)、酶标板(96孔,Corning)均购自上海生物工程有限公司。

1.1.5 病原菌的分离培养鉴定

1.1.5.1 病原菌的分离

病原菌的分离采用组织分离法,选择PSA(马铃薯蔗糖琼脂培养基:土豆200 g,蔗糖20 g,琼脂20 g,蒸馏水1 000 mL)进行分离培养。用水将病叶与病穗冲洗干净,在无菌操作台内,于75%乙醇中浸泡病样组织5 s左右,再移至升汞溶液(0.1%)中浸泡3~5 min,最后用无菌水冲洗3遍,将病样移至加入链霉素的PSA平板上(每个平板可放置5~10个病块组织),于25℃培养箱培养。待菌落长出后,挑取菌丝于显微镜下镜检,将疑似镰孢菌的菌落转移至PSA平板中进行纯化培养,经数次纯化后进行单孢分离。

单孢分离:采用标准的稀释分离法分离单孢子,方法参照董汉松《植病研究法》^[13]并适当改良。分离到的菌株培养一周后,刮取一定量的孢子制成孢子悬浮液1 mL,稀释孢子悬浮液并进行镜检。待孢子悬浮液浓度稀释为在10×10倍显微镜下观察每个视野的平均孢子数为1~5个,移液器吸取含有单个孢子悬浮液到WA平板上,均匀涂板,设置5个重复,在25℃培养箱中培养,待长出小菌落后,挑取菌落到新的PSA平板,7 d后,观察菌落生长状况,并用试管斜面培养基保存菌种。

1.1.5.2 分离病原菌的鉴定

(1)形态学鉴定

通过观察菌落菌丝生长过程中的形态特征,结合菌株培养条件等,对分离菌株进行鉴定,用PSA培养基培养菌株,在菌落生长过程中,观察PSA平板上菌落的形态、颜色等特征。选用低营养培养基(Synthetic low Nutrient Agar, SNA)用于镰孢菌微观形态的观察,病原菌菌株鉴定主要参照

《The Fusarium Laboratory Manual》、《真菌鉴定手册》进行比对。

(2)分子生物学鉴定

挑取分离菌株的菌块,接种到PDB(Potato Dextrose)培养基中,25℃、180 r/min振荡培养,待液体培养基菌丝茂密时,收集菌丝体。采用CTAB法提取基因组DNA,进行PCR扩增。

本试验中用到的引物为真菌通用引物:

ITS1 5'-CGTAACAAGGTTTCCGTAGGTGAAC-3'

ITS2 5'-TTATTGATATGCTTAACTCAGCGGG-3'

将PCR扩增产物送上海生工进行测序。将测序结果在Gen Bank数据库中进行比对。

1.2 动物免疫

将6~8周的BALB/C雌鼠分为两组,把免疫抗原ZEN-BSA和ZEN-OVA溶解在0.01 mol/L无菌PBS溶液中,乳化于弗氏完全佐剂中,每组分别注射20 μg ZEN-BSA和ZEN-VOA溶液(背部皮下多点免疫注射)。之后的免疫则选用不完全弗氏佐剂。经过3次免疫后,割小鼠的尾部,取血测其滴度,选出抗血清效价最高的小鼠进行细胞融合,在细胞融合前再进行一次免疫,然后取小鼠的脾细胞进行融合。

1.3 脾细胞与杂交瘤细胞制备

选出滴度最高的免疫小鼠,眼静脉取血收集到EP管中,在37℃温箱中静置1 h,取出后置于4℃冰箱中保存,次日离心取上清液,-20℃冰箱中保存,将取血后的小鼠颈椎脱臼处死,放入75%乙醇中浸泡2~3 min消毒;无菌条件下取出脾脏;放到装有10 mL基础培养液的小烧杯内,用镊子梳刮掉脾脏上的脂肪,将处理过的脾脏放入另一个盛有20 mL基础培养液的烧杯内,用注射器吸取基础培养液,反复冲至脾脏呈半透明状;收集烧杯中的脾细胞悬液。将计数后的骨髓瘤细胞与小鼠脾细胞按1:1比例融合后,放入HAT培养基(H—Hypoxanthine次黄嘌呤,A—Aminopterin甲氨嘌呤,T—Thymidine胸腺嘧啶核苷),把融合的细胞进行重悬,之后加入到96孔酶标板中,培养一周后取上清液,分别加入到BSA和ZEN-BSA的96孔酶标板中,筛选出阳性杂交瘤细胞。

1.3.1 细胞融合及培养观察

离心管中加入按1:1比例混合Sp2/0细胞与脾细胞,混合均匀,离心后去除上清液,加入1 mL 50%的PEG 1 400,摇匀后再加入25 mL DMEM培

养液,终止反应。1 400 r/min离心5 min。去除上清液,重悬细胞,加入30 mL HAT培养液(37℃条件下预热),慢慢混匀,再进行离心洗涤后,保存在HAT培养基中;于96孔酶标板上加入280 μL/孔融合细胞悬液,培养一周后观察结果,筛选阳性孔制备单克隆抗体。

1.4 间接ELISA的建立

应用常见的间接ELISA法步骤,滴定法测定抗体及血清的最适工作浓度、抗原最佳包被量。用包被缓冲液稀释ZEN-BSA,4℃下培养过夜;弃包被液,洗涤,加入封闭液,封闭作用2 h后晾干;小鼠阳性及阴性血清或抗体作梯度稀释37℃温育1 h。甩干,洗涤,温育40 min加二抗(二抗为1:8 000稀释的HRP标记羊抗鼠二抗)温育1 h;甩干,洗涤后加入底物溶液100 μL/孔,避光作用15 min;滴加终止液;测定OD_{450 nm}值,最后加入底物液100 μL显色,避光孵育10~15 min,加入终止液终止反应,在450 nm/630 nm双波长下读出数据。

1.5 单克隆抗体交叉特异性分析

间接ELISA检测替代ZEN作为竞争抗原的ZEN的类似物和ZEN异构体。

交叉反应率: $CR^{[13]} = IC_{50}(ZEN) \div IC_{50}(\text{竞争物}) \times 100\%$

1.6 间接竞争ELISA的建立

每个孔加50 μL ZEN标准溶液,单抗每孔也加入50 μL,设置3个组重复,将不加毒素作为对照,测定其OD_{492 nm}值,3个重复组最后取平均值。添加毒素的各孔OD_{492 nm}值用B代表,用B₀表示对照组OD_{492 nm}值,则ZEN对单抗的抑制率为B/B₀(%)。

制作竞争抑制曲线:参照李岩松等^[14]方法,以平均OD_{492 nm}值为纵坐标,以ZEN浓度对数值为横坐标,建立间接竞争ELISA方法制备标准曲线。

1.7 加标样品检测

添加回收率测定:在不含ZEN的玉米样品中分别进行3个质量浓度的添加回收实验,选择的加标浓度为25、50、100、500 μg/kg,每个加标水平做5个重复,计算其回收率及其方差和变异系数。

回收率(%)=[(总的ZEN含量-空白样品中ZEN含量)/添加入ZEN的量]×100%

2 结果与分析

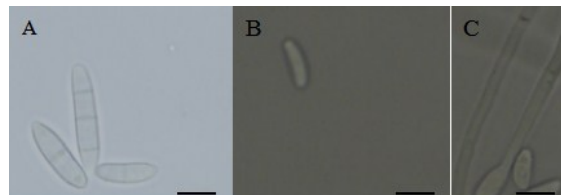
2.1 镰孢菌的鉴定

共分离254株镰孢菌,根据形态学观察和分子生物学的鉴定,鉴定出6个种的镰孢菌:腐皮镰孢菌(*Fusarium solani*)、禾谷镰孢菌(*Fusarium gra-*

minearum)、轮枝镰孢菌(*Fusarium verticillioides*)、胶孢镰孢菌(*Fusarium subglutinans*)、尖孢镰孢菌(*Fusarium oxysporum*)和层生镰孢菌(*Fusarium proliferatum*)。

2.1.1 腐皮镰孢菌(*Fusarium solani*)

25℃于PSA平板上培养4 d,测量菌落的直径为30~55 mm,气生菌丝呈乳白色或浅灰色绒状。大型分生孢子为马特形,宽度较大,弯曲的弧度比较小,两端较钝,通常具有2~8个分隔,(25~60) μm×(4~6) μm。产生的小型分生孢子数量较多,肾形或卵圆形,无分隔或具有1个分隔,(6~15) μm×(3~5) μm。产孢细胞比较长,长度大于50 μm,为单瓶梗,分枝较多。厚垣孢子呈椭圆形^[15](图1)。

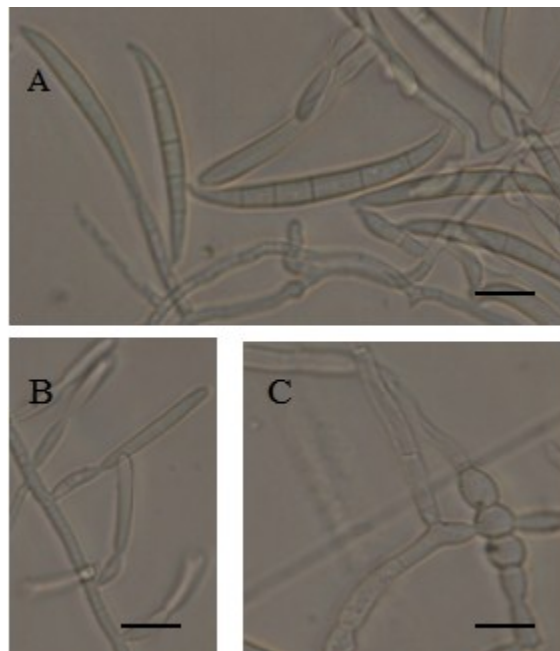


A. 大型分生孢子; B. 小型分生孢子; C. 产孢细胞

图1 腐皮镰孢菌

2.1.2 禾谷镰孢菌(*Fusarium graminearum*)

在PSA培养基上培养4 d后测量菌落直径为45~65 mm,生长速度较快。气生菌丝比较浓密,开始为白色,因为禾谷镰孢菌能够产生紫红色色素,菌丝渐渐变为紫红色,菌落中央菌丝呈金黄色,菌落背面也因色素呈现紫红色。大型分生孢



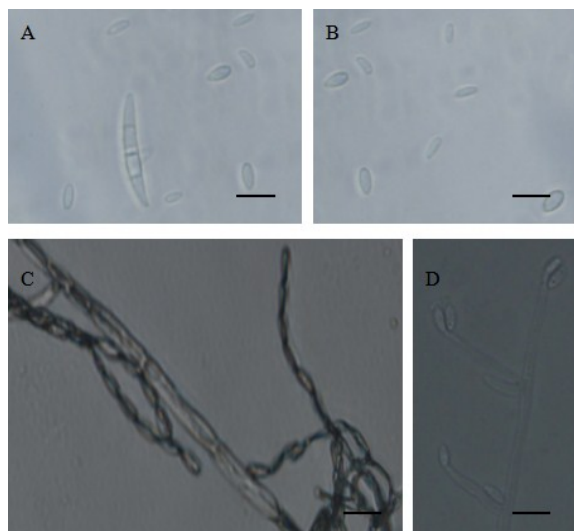
A. 大型分生孢子; B. 产孢细胞; C. 厚垣孢子

图2 禾谷镰孢菌

子($40 \sim 75$) $\mu\text{m} \times (3.5 \sim 6)$ μm ,为弧度较小的镰刀形,孢子顶端尖锐呈锥状,通常具有3~6个隔膜。只产生极少量小型分生孢子。大型分生孢子或菌丝常会形成球形的厚垣孢子,单生、聚生或串生(图2)。

2.1.3 轮枝镰孢菌(*Fusarium verticillioides*)

PSA上25℃黑暗培养4 d后,菌落直径为35~55 mm,气生菌丝生长浓密,初始为白色,后因菌株分泌色素,渐变为淡紫色,后期颜色逐步加深为蓝紫色或紫红色。大型分生孢子数量较少,呈现为细长的镰刀形,孢子顶端渐变为锥形,一般具有3~5个分隔,(30~50) $\mu\text{m} \times (2.5 \sim 4)$ μm 。小型分生孢子产生的数量很多,呈链状,且分生孢子链的长度一般 $>50\mu\text{m}$,椭圆形或棒形,不具有分隔,(6~20) $\mu\text{m} \times (2.5 \sim 4.5)$ μm (图3)。



A. 大小型分生孢子; B. 小型分生孢子;
C. 链状分生孢子; D. 产孢细胞

图3 轮枝镰孢菌

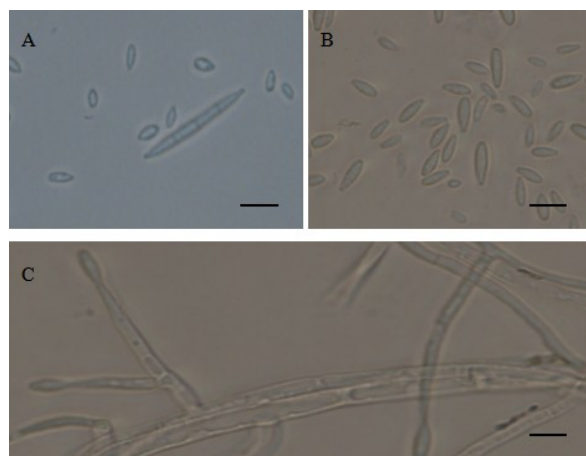
2.1.4 胶孢镰孢菌(*Fusarium subglutinans*)

在PSA平板上培养4 d后的菌落直径为35~50 mm,气生菌丝薄绒状,菌丝最初为白色因分泌色素渐渐变为紫色,从菌落背面观察,产生了深紫色色素圈。大型分生孢子产生较少,细长梭形,顶细胞弯曲,通常有3~6个分隔,(32~40) $\mu\text{m} \times (3.3 \sim 5)$ μm 。产生大量的假头生的小型分生孢子,着生于单瓶梗或复瓶梗上,椭圆形,无分隔,(5~15) $\mu\text{m} \times (2 \sim 4)$ μm 。偶可见2~3个分隔的中型分生孢子,此类分生孢子可顺利过渡为大型分生孢子(图4)。

2.1.5 尖孢镰孢菌(*Fusarium oxysporum*)

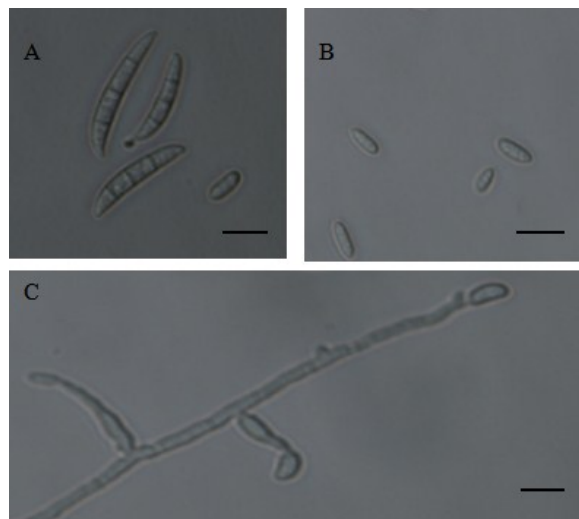
PSA培养基上培养4 d后菌落直径为45~50 mm,菌落生长速度较快,气生菌丝棉絮状、丝绒

状、毡状,扭结成网状结构。菌落整体呈白色、粉色至紫色,菌落背面常产生蓝紫色色素,菌株间具有较大的形态差异。大型分生孢子现较细镰刀形,顶端细胞较长渐细渐尖,一般为2~6个分隔,(20~45) $\mu\text{m} \times (3.5 \sim 5)$ μm 。产生的小型分生孢子数量较多,卵形、椭圆形或肾形,0~1个分隔,(5~14) $\mu\text{m} \times (2.5 \sim 5)$ μm 。单瓶梗产孢,且产孢细胞较短。厚垣孢子呈球形(图5)。



A. 大小型分生孢子; B. 小型分生孢子; C. 产孢细胞

图4 胶孢镰孢菌

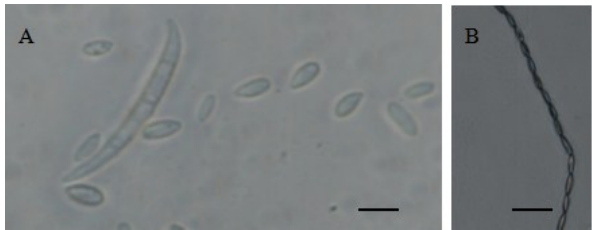


A、B. 大型分生孢子; C. 假头状产孢细胞

图5 尖孢镰孢菌

2.1.6 层生镰孢(*Fusarium proliferatum*)

PSA上生长速度中等,PSA培养4 d的菌落直径为55~65 mm,气生菌丝最初为白色绒状,渐渐呈淡紫色,从菌落背面观察,也变成紫色。大型分生孢子为典型镰刀形,较为细长,通常不易产生,顶细胞弯曲,3~5个分隔,(30~55) $\mu\text{m} \times (2.3 \sim 4)$ μm 。小型分生孢子链状串生或大量假头生,棒形或梨形,无分隔,(6~18) $\mu\text{m} \times (2.5 \sim 4.5)$ μm (图6)。



A. 大小型分生孢子; B. 链状分生孢子

图6 层生镰孢菌

2.2 镰孢菌的分离频率

对东北三省采集样品进行分离纯化,结果见表1,共分离鉴定得到腐皮镰孢菌(*F. solani*)、禾谷镰孢菌(*F. graminearum*)、轮枝镰孢菌(*F. verticillioides*)、胶孢镰孢菌(*F. subglutinans*)、尖孢镰孢菌(*F. oxysporum*)和层生镰孢菌(*F. proliferatum*)6种镰孢菌共214株,其中分离频率最高的是禾谷镰孢菌(58.1%)。

表1 小麦、玉米和水稻病株镰孢菌分离频率

种名	总菌株数	寄主植物		
		小麦	玉米	水稻
		分离菌株数及分离频率(%)	分离菌株数及分离频率(%)	分离菌株数及分离频率(%)
腐皮镰孢菌	2	0(0.00)	2(1.64)	0(0.00)
禾谷镰孢菌	108	36(58.06)	72(59.02)	0(0.00)
轮枝镰孢菌	30	5(15.21)	25(20.49)	0(0.00)
胶孢镰孢菌	4	0(0.00)	4(3.35)	0(0.00)
尖孢镰孢菌	45	9(7.38)	12(9.8)	24(80)
层生镰孢菌	25	12(19.35)	7(5.7)	6(20)

2.3 单克隆抗体的特异性检测

ZEN、β-玉米赤霉烯醇、α-玉米赤霉醇、β-玉米赤霉醇的IC₅₀值为(1.79±0.1)ng/g, (7.45±0.4)ng/mL, (0.949±0.15)ng/mL和(4.09±0.13)ng/mL,而脱氧雪腐镰刀菌烯醇和黄曲霉毒素的IC₅₀则均大于40ng/mL。

单克隆抗体的特异性检测结果显示抗-ZEN单克隆抗体与ZEN、β-玉米赤霉烯醇、α-玉米赤霉醇、β-玉米赤霉醇结合率分别为100%、25.6%、188.7%和43.9%(图7),而与脱氧雪腐镰孢菌烯醇和黄曲霉毒素的结合率则<1.0%,证明试验所获得的单克隆抗体具有较高特异性。

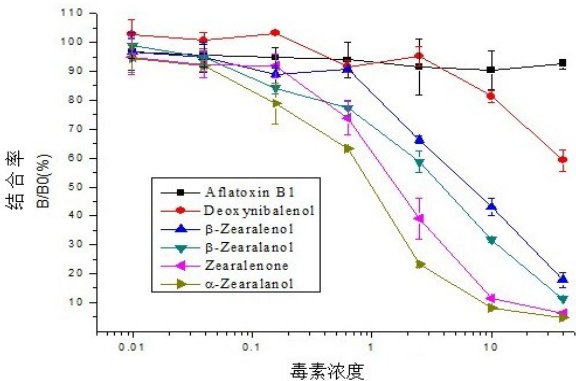


图7 ZEN与ZEN类似物的交叉反应

α-玉米赤霉烯醇、β-玉米赤霉烯醇和β-玉米赤霉醇通常是玉米赤霉烯酮的代谢产物,α-玉米赤霉烯醇、β-玉米赤霉烯醇和β-玉米赤霉醇

的含量在谷物中通常很低,与ZEN相比几乎可以忽略不计,因此试验所制备的单克隆抗体能够满足对ZEN毒素检测的要求。

2.4 ZEN标准曲线的绘制

以ZEN标准品四倍稀释,标准毒素溶液浓度分别为0、0.07656、0.390625、1.5625、6.25、25和100ng/mL作为竞争抗原来制作标准抑制曲线(图8),曲线稳定。该曲线检测限为0.4ng/mL,检测范围为0.4~25.00ng/mL,在此检测范围内该方法更具灵敏性。

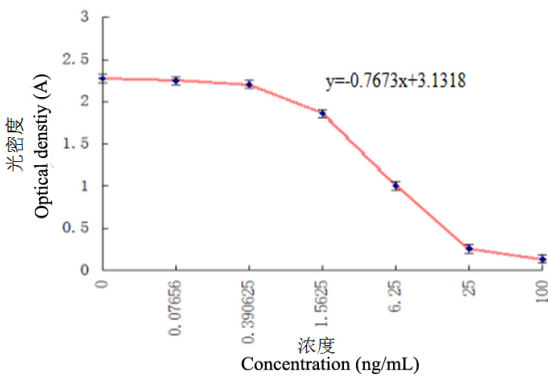


图8 ZEN标准曲线

2.5 样品回收率

加入不同浓度的ZEN毒素到相同玉米样品中,用建立的ELISA法测定其含量,设置不含有ZEN毒素的玉米样品作为空白对照。回收测定结果显示(回收率试验结果见表2),ZEN在浓度范

围 25 ~ 500 ng/mL 时,回收率在 79% ~ 112%。回收效果较好,相对标准偏差在 10%左右,说明检测稳定性很好。

表2 ZEN 添加样品回收率试验

检测样品	加入浓度 (ng/mL)	检出浓度 (ng/mL)	回收率±平均标准偏差 (%)	变异系数 (%)
玉米	500	461.9±14.5	92.4±3.0	3.1
	100	70.44±8.7	70.4±8.7	12.4
	50	44.6±4.7	88.9±9.6	10.8
	25	27.2±0.8	108.7±3.2	2.9

2.6 镰孢菌的ZEN产毒能力

ZEN 标准菌株为 CBS 菌株,通过检测培养菌株的液体培养基中 ZEN 的含量,来确定菌株分泌 ZEN 毒素的含量,ELISA 法灵敏、迅速,能够快速检测大批量样品。应用 ELISA 检测产品中毒素含量,应用液体培养基来培养分离菌株,通过检测液体培养基中 ZEN 含量,可确定镰孢菌分泌 ZEN 的含量。检测分离菌中 ZEN 毒素含量结果显示(表 3),检测菌株的毒素含量范围在 0.27 ~ 1.61 μg/L。产毒能力比较高的均为禾谷镰孢菌,其中毒素含量最高是 1.61 μg/L。只有 1.4%的镰孢菌菌株具有较高产毒能力。

表3 分离镰孢菌株ZEN产毒能力

菌株代码	菌株种名	ZEN 产毒能力 (μg/L)
CBS 110250	<i>Fusarium graminearum</i>	1.61
H-1	<i>Fusarium graminearum</i>	0.71
H-2	<i>Fusarium graminearum</i>	0.48
H-3	<i>Fusarium graminearum</i>	0.27
其它	<i>Fusarium spp.</i>	<0.1

3 讨论与结论

试验所获得的抗 ZEN 克隆抗体灵敏度高、特异性好。通过单克隆抗体建立的间接竞争 ELISA 方法与近期国内相关报道比较,在最低检测限(0.04 ng/mL)时,回收率为 79% ~ 112%,比刘涛等^[17]人报道更具有优势。本研究所获得的单克隆抗体建立的检测方法的检测区间为 0.4 ~ 25.00 ng/mL,明显优于张东升等^[16]报道其检测区间为 1 ~ 20 μg/L,具有更好的使用范围,可满足含有不同浓度的玉米赤霉烯酮的样本的定量检测。关于 ZEN 的 ELISA 传统检测方法建立较早,在国产试剂盒方面,玉平等开发的 ZEN 竞争 ELISA 检测试剂盒检出限为 1 ng/mL,本实验方法最低检测限为 0.4 ng/mL,与上述检测方法相比更具优势。其灵敏度要高于 AOAC ELISA 法(800 ng/mL)^[17]。在加标回收率实

验中,当 ZEN 在 25 ~ 500 ng/mL,结果显示 ZEN 回收率在 79% ~ 112% 之间,具有较大优势,建立 ELISA 检测方法简捷、灵敏度高,为 ZEN 检测试剂盒开发研究奠定夯实基础,同时更好地保障了人类食品与动物饲料安全。

利用试验建立 ELISA 方法检测分离镰孢菌中 ZEN 毒素含量,发现产毒能力较高的镰孢菌均为禾谷镰孢菌,所以在今后的 ZEN 毒素检测中,要重点检测禾谷镰孢菌病害,同时在试验操作中发现 ELISA 法用于检测大批量镰孢菌毒素含量操作简单易行,耗时短。

现今检测 ZEN 的常用方法有薄层色谱法、高效液相色谱法等,均能准确检测 ZEN 毒素,但其检测过程过于复杂,且耗时长,成本高,无法快速检测大批量样品;而 ELISA 检测法是国际上比较公认的快速准确的方法^[18],具有特异性强,成本低和灵敏度高等优点,更适用于基层机构筛选和检测大量样品,具有广泛的应用前景。

参考文献:

[1] UllstruP A J.An undescribed ear rot of corn caused by Physalospora zeae[J].Phytopathology, 1946, 36(3): 201-212.

[2] Anjorin S T, Makun H A, Adesina T, et al. Effects of Fusarium verticill: oides, its metabolites and neem leaf extract on germination and vigour indices of maize (Zea mays L.)[J]. African Journal of Biotechnology, 2008, 7(14): 2402-2406.

[3] 董怀玉,王大为,王丽娟,等.北方春玉米区玉米穗腐病禾谷镰孢菌复合 SCAR 类型测定[J].东北农业大学学报, 2015 (10): 23-28.

[4] 任金平,吴新兰,孙秀华.吉林省玉米镰刀菌穗腐病和茎腐病病原菌传染循环研究[J].玉米科学, 1995(增刊): 25-28.

[5] 苏永腾,刘 强.谷物霉菌毒素的危害及其控制措施的研究[J].中国食物与营养, 2010(4): 9-12.

[6] McMullen M, Jones R, Gallenberg D. Scab of wheat and barley: a re-emerging disease of devastating impact[J]. Plant Disease, 1997, 81(12): 1340-1348.

[7] 史建荣,仇剑波,董 飞,等.小麦镰孢菌毒素及其发生风险研究进展[J].麦类作物学报, 2016, 36(2): 129-135.

- [8] Stopa E, Gajęcka M, Babińska I, et al. The effect of experimental exposure to low doses of zearalenone on uterine histology and morphometry in prepubertal bitches[J]. *Theriogenology*, 2014, 82(4): 537-545.
- [9] 王 耀, 张改平, 胡晓飞, 等. 镰孢菌毒素及其人工抗原制备研究进展[J]. *中国公共卫生*, 2011, 27(9): 1157-1159.
- [10] Placinta C M, D'Mello J P F, Macdonald A M C, et al. A review of worldwide contamination of cereal grains and animal feed with *Fusarium* mycotoxins[J]. *Animal Feed Science & Technology*, 1999, 78(1 - 2): 21-37.
- [11] 李荣涛, 谢 刚, 付鹏程, 等. 小麦和玉米中玉米赤霉烯酮污染情况初探(I) [J]. *粮食储藏*, 2004, 33(5): 36-38.
- [12] Engvall E, Perlmann P. Enzyme-linked immunosorbent assay (ELISA). Quantitative assay of immunoglobulin G[J]. *Immunochemistry*, 1971, 8(9): 871-874.
- [13] 董汉松. 植病研究法[M]. 北京: 中国农业出版社, 2012: 55-70.
- [14] 李岩松, 周 玉, 谭成成, 等. 环丙沙星间接竞争ELISA(ic-ELISA)检查方法的建立[J]. *中国卫生检验杂志*, 2008, 18(8): 1480-1481.
- [15] 陈 霞, 刘 东, 等. 黄瓜枯萎病病株镰孢菌的分离与鉴定[J]. *东北农业大学学报*, 2010, 41(7): 37-44.
- [16] 张东升, 王 虎, 蔡建荣, 等. 玉米副产物中玉米赤霉烯酮的ELISA测定[J]. *饲料工业*, 2008, 29(1): 38-40.
- [17] 刘 涛, 王向红, 常彧等. 直接竞争酶联免疫法检测大麦中玉米赤霉烯酮[J]. *食品与机械*, 2008(2): 97-99, 117.
- [18] European Commission. Opinion of the scientific committee on food on fusarium toxins .Part2 : zearalenone(ZEN)[DB/OL]. europa. int /comm/ food fs/ sc /scf out65-en. Pdf. 2002-06-22.

(责任编辑:王 昱)