

化学发光酶联免疫法检测苏丹红 I

范 艳, 孟 玮, 朱立鑫, 刘仁荣*, 许 龙, 裘雪梅, 杨帆帆
(江西科技师范大学生命科学学院, 江西 南昌 330013)

摘 要: 为检测食品中苏丹红 I 残留, 建立间接竞争化学发光酶联免疫分析 (chemiluminescent enzyme immunoassay, CLEIA) 法。通过优化包被抗原中本抗原与载体物质的量比、包被抗原质量浓度、抗体稀释比例, 建立竞争抑制曲线。线性范围为 0.156~5 ng/mL, 最低检测限为 0.078 9 ng/mL, IC_{50} 为 0.679 ng/mL。CLEIA 回收率为 75.08%~112.18%, 变异系数为 8.89%~15.61%; 通过与酶联免疫吸附 (enzyme-linked immunosorbent assay, ELISA) 法进行比较, 在相同抗原抗体质量浓度条件下, CLEIA 法测定的 IC_{50} 较 ELISA 方法降低 30%, 具有较高的灵敏度。

关键词: 苏丹红 I; 化学发光酶联免疫分析; 酶联免疫吸附分析

Determination of Sudan I by Chemiluminescent Enzyme Immunoassay

FAN Yan, MENG Wei, ZHU Lixin, LIU Renrong*, XU Long, QIU Xuemei, YANG Fanfan
(College of Life Science, Jiangxi Science and Technology Normal University, Nanchang 330013, China)

Abstract: An indirect competitive chemiluminescent enzyme immunoassay (CLEIA) was developed for the detection of Sudan I in food products. The CLEIA conditions including molar ratio of coating antigen to carrier, antigen concentration, and dilution ratio of antibody were optimized. In the standard curve of the optimized CLEIA, the linear range was 0.156–5 ng/mL, the half maximal inhibitory concentration (IC_{50}) was 0.679 ng/mL and the limit of detection (LOD) was 0.078 9 ng/mL. The CLEIA showed good recoveries with spiked chili powder ranging from 75.08% to 112.18%. Compared with ELISA method, the IC_{50} values of CLEIA was reduced by 30%. The proposed method has a high sensitivity.

Key words: Sudan I; chemiluminescent enzyme immunoassay (CLEIA); enzyme-linked immunosorbent assay (ELISA)

中图分类号: TQ610.7; O657.3

文献标志码: A

文章编号: 1002-6630 (2015) 12-0209-04

doi:10.7506/spkx1002-6630-201512039

苏丹红染料是一系列化学合成的脂溶性偶氮化合物, 在工业上广泛应用, 如地板、塑料、印刷用油墨等的染色^[1]。因其具有良好的着色性, 不法商贩将苏丹红染料作为食品添加剂加入辣椒、番茄等食品中, 进入人体内的苏丹红经各种酶系代谢后, 形成的部分代谢产物具有致突变、致癌变的生物活性^[2-3]。1995年欧盟国家已经禁止将苏丹红作为食用色素, 2005年英国食品标准署就食品添加苏丹红色素发出警告^[4], 国际癌症研究机构将苏丹红归为三类致癌物。因此需要对食品中含有的苏丹红染料进行监控^[5-6]。

现阶段检测苏丹红染料的方法有色谱法、光谱法、免疫检测方法和电化学方法^[7-9]等。色谱法主要包括液相色谱-质谱联用^[10-12]、气相色谱-质谱联用、高效液相色谱-二极管阵列检测器和电喷雾电离质谱联用

等^[13-15]。光谱法有红外光谱快速检测^[16], 这些方法具有应用广泛、重复性好和检测结果准确等优点, 但需要昂贵的设备、复杂的样品处理过程和较长的检测时间。免疫学检测方法主要有酶联免疫吸附 (enzyme-linked immunosorbent assay, ELISA) 法^[17-18]、化学发光酶联免疫 (chemiluminescent enzyme immunoassay, CLEIA) 法^[19-22]等。CLEIA法是化学发光法和免疫分析法结合的产物, 同时具备化学发光法的高灵敏度和免疫分析法的高选择性^[23]。近年来已经大规模应用到食品有毒有害残留分析。

本实验基于鲁米诺-辣根过氧化物酶系统, 对实验因素进行了探索和优化, 建立了检测苏丹红 I (Sudan I) 的间接竞争CLEIA方法。该方法操作简便、灵敏度高、特异性好, 能满足大规模样品的快速筛选。

收稿日期: 2014-08-03

基金项目: 江西省自然科学基金项目 (20122BAB214006); 江西省教育厅科技项目 (GJJ13573)

作者简介: 范艳 (1990—), 女, 硕士研究生, 研究方向为食品安全检测。E-mail: fy12271227@163.com

*通信作者: 刘仁荣 (1969—), 男, 教授, 博士, 研究方向为食品安全检测。E-mail: lilirenrong@hotmail.com

1 材料与方法

1.1 材料与试剂

Sudan I 标准品、牛血清白蛋白 (bovine serum albumin, BSA)、辣根过氧化物酶标记的羊抗小鼠IgG 美国Sigma公司; 抗Sudan I 单克隆抗体 本实验室自制; 化学发光鲁米诺底物 厦门赫利森公司。

包被液: 0.01 mol/L磷酸盐缓冲液 (phosphate buffer saline, PBS), pH 7.4; 封闭液: 50 g/L脱脂奶; 清洗液: 含0.05%吐温-20的磷酸盐缓冲液; 标准品稀释液: 30%甲醇溶液。实验所用化学试剂均为分析纯。

1.2 仪器与设备

Luminoskan Ascent化学发光仪、Multiskan MK3酶标仪、Wellwash versa洗板机 美国Thermo公司; 96孔酶标板与96孔发光板 美国Costar公司。

1.3 方法

1.3.1 包被抗原Sudan I-BSA的制备

采用活泼酯法进行半抗原与载体蛋白的偶联, 称取羧基化Sudan I 2 mg^[24], N-羟基琥珀酰亚胺2.31 mg, 碳二亚胺3.85 mg, 溶于400 μ L N,N-二甲基甲酰胺后, 在21 $^{\circ}$ C, 120 r/min 反应12 h。称取30 mg BSA溶于12 mL 0.13 mol/L NaHCO₃溶液中。将活性酯溶液按照不同物质的量比例缓慢滴入BSA溶液中, 17 $^{\circ}$ C, 120 r/min 反应8 h。取出反应液放入透析袋中, 在PBS中透析3 d, 偶联产物用紫外光谱扫描, 根据其在波长280、490 nm处的吸光度A分析测定偶联物的物质的量比。

1.3.2 间接竞争CLEIA法的建立

用PBS稀释Sudan I-BSA包被在96孔化学发光板, 120 μ L/孔, 4 $^{\circ}$ C包被过夜; 用PBST洗板4次后, 每孔加入320 μ L脱脂奶在37 $^{\circ}$ C保温保湿2 h。洗板4次后, 每孔加入50 μ L合适质量浓度的抗体稀释液和50 μ L标准品稀释液, 在37 $^{\circ}$ C保温保湿45 min。洗板4次, 加入1:3 000酶标二抗, 37 $^{\circ}$ C保温保湿45 min。洗板4次, 加入化学发光底物100 μ L/孔, 立即用化学发光检测仪检测各孔化学发光强度。

1.3.2.1 最佳包被抗原质量浓度的选择

用方阵滴定法, 选取0.5、1、2、4、8 μ g/mL质量浓度的Sudan I-BSA包被96孔板, 抗Sudan I 单克隆抗体按照1:16 000、1:32 000、1:64 000、1:128 000、1:256 000、1:512 000、1:1 024 000进行稀释, 按照间接CLEIA法步骤, 选取最佳包被质量浓度。

1.3.2.2 最佳抗体稀释比例的选择

按照选取的最佳Sudan I-BSA质量浓度包被96孔板后, 选择1:32 000、1:64 000、1:128 000、1:256 000这4种抗体稀释比例按照间接竞争法, 测定对应的化学发光值 (relative light unit, RLU) 和IC₅₀, 以IC₅₀和

RLU_{max}/IC₅₀作为评价标准。RLU_{max}/IC₅₀最大的选为最佳抗体稀释比例。

1.3.2.3 间接竞争CLEIA法标准曲线的建立

按照确定的最佳抗原包被质量浓度, 最佳抗体稀释比例, 以标准品Sudan I 质量浓度的对数为横坐标, 以 I/I_0 (I 为不同标准品质量浓度时的RLU; I_0 为标准品质量浓度为0 ng/mL时的RLU) 为纵坐标, 通过RIDA WIN免疫分析软件, 建立标准曲线。

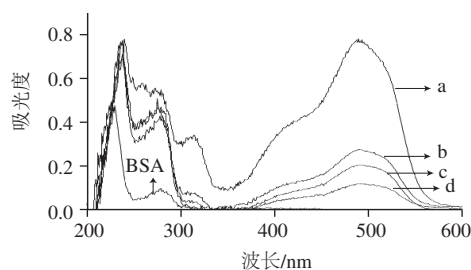
1.3.3 实际样品的加标回收及与ELISA方法的对比

称取辣椒粉1 g放入离心管中, 分别添加Sudan I 标准品0、0.1、0.5、1 μ g/g。每管加入6 mL乙腈, 四管辣椒粉漩涡振荡器剧烈振荡10 min后, 超声波提取20 min, 然后4 500 r/min离心15 min。取上清液3 mL, 放入玻璃试管中, 用N₂吹干, 每管加入1 mL甲醇溶解, 然后加入蒸馏水配制成30%的甲醇溶液, 分别用CLEIA和ELISA方法进行检测 (各测4次, 取平均值)。

2 结果与分析

2.1 Sudan I-BSA人工抗原的制备

通过活泼酯法将Sudan I 与BSA偶联并透析后得到了人工抗原Sudan I-BSA, 人工抗原的紫外光谱扫描结果见图1。4条曲线代表4种不同物质的量比例偶联的Sudan I-BSA。BSA标准品的特征吸收峰是280 nm, Sudan I 的特征吸收峰490 nm, 人工抗原在波长280 nm与490 nm处均出现了吸收峰, 通过绘制Sudan I 与BSA的标准曲线, 计算得出物质的量偶联比例。



a~d.物质的量比分别为11.8:1、2.05:1、0.95:1、0.27:1。

图1 4种偶联比的Sudan I-BSA紫外扫描图

Fig.1 UV spectra of Sudan I-BSA with different conjugation ratios

2.2 CLEIA工作条件的确定

2.2.1 包被抗原质量浓度的确定

根据方阵滴定结果, 在一定的抗体稀释比例下, 2 μ g/mL Sudan I-BSA包被时的发光强度明显高于0.5、1 μ g/mL。4 μ g/mL与8 μ g/mL包被时, 发光强度变化逐渐平缓, 分别将Sudan I-BSA用2、4 μ g/mL和8 μ g/mL 3种质量浓度进行包被, 比较其IC₅₀变化, 见图2, 在相同的抗体稀释比例下, 2 μ g/mL包被时测定的IC₅₀低于4 μ g/mL

与8 $\mu\text{g/mL}$ ，综合RLU与 IC_{50} 选择2 $\mu\text{g/mL}$ 作为其最优包被质量浓度。

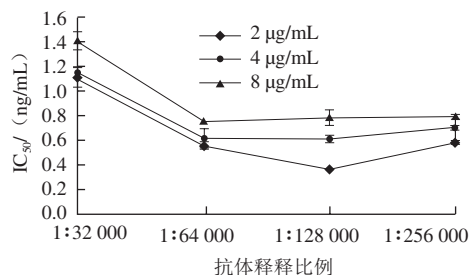


图2 包被质量浓度对CLEIA的影响

Fig.2 Effect of coating antigen concentration on CLEIA

2.2.2 抗体稀释比例的确定

Sudan I-BSA包被质量浓度为2 $\mu\text{g/mL}$ 时，随着抗体稀释比例的增大， IC_{50} 先明显降低，后变化平缓。RLU随抗体稀释比例的增大而显著减小。根据 $\text{RLU}_{\text{max}}/\text{IC}_{50}$ 值的变化，在抗体稀释比例为1:64 000时 $\text{RLU}_{\text{max}}/\text{IC}_{50}$ 达到最大，见图3。所以选择抗体最佳稀释比例为1:64 000。

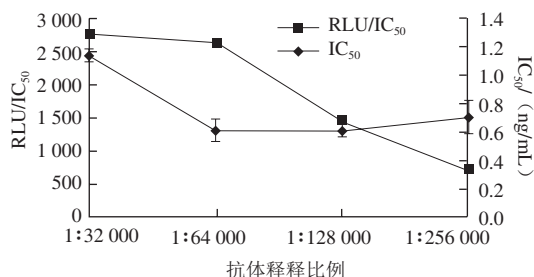


图3 抗体稀释比例对CLEIA的影响

Fig.3 Effect of antibody dilution ratio on CLEIA

2.2.3 包被抗原Sudan I-BSA的半抗原与载体偶联比的影响

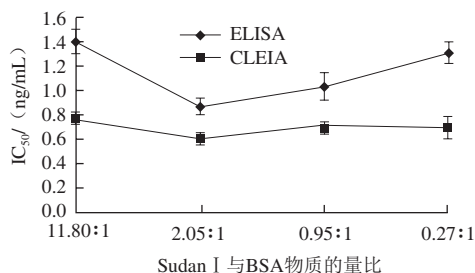


图4 Sudan I-BSA物质的量比对CLEIA与ELISA的影响

Fig.4 Effects of molar ratio of Sudan I to BSA on CLEIA and ELISA

Sudan I-BSA用4种偶联比例用活泼酯法合成后，按照2.2.1节和2.2.2节的优化过程得到抗原包被质量浓度和抗体稀释比例后，4种不同偶联比的抗原对CLEIA和ELISA两种方法测定的 IC_{50} 影响见图4。由图4可知，不同的偶联比对CLEIA的 IC_{50} 影响不大，对ELISA，偶联

比在0.27:1和11.8:1时， IC_{50} 都显著上升，在偶联比值为2.05:1时， IC_{50} 最小，证明Sudan I与BSA物质的量比为2.05:1时，比较合适。所以包被抗原选择偶联比为2.05:1的Sudan I-BSA。

2.2.4 CLEIA和ELISA标准曲线的建立

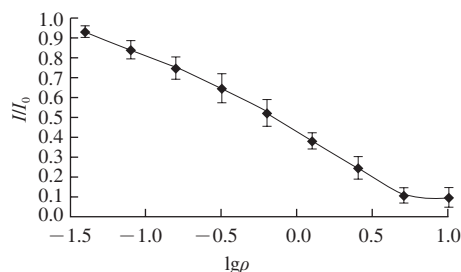


图5 CLEIA间接竞争抑制曲线

Fig.5 Indirect competitive inhibition curve of CLEIA

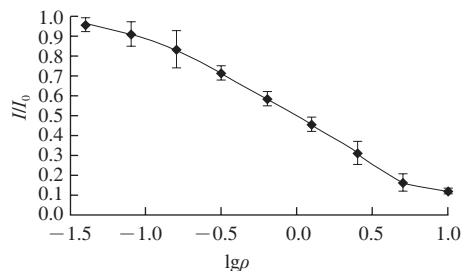


图6 ELISA间接竞争抑制曲线

Fig.6 Indirect competitive inhibition curve of ELISA

Sudan I-BSA包被质量浓度为2 $\mu\text{g/mL}$ ，抗体稀释比例为1:64 000，建立的CLEIA间接竞争曲线见图5。标准品Sudan I质量浓度的对数为横坐标，以 I/I_0 为纵坐标。 IC_{50} 为0.679 ng/mL ，线性范围是0.132~5 ng/mL ，线性方程为 $y = -0.45x + 0.4037$ ， $R^2 = 0.9891$ ；选择 IC_{10} 为最低检测限，最低检测限是0.0789 ng/mL 。建立的ELISA间接竞争曲线见图6， IC_{50} 为1.0 ng/mL ，线性范围是0.2~5 ng/mL ，线性方程为 $y = -0.443x + 0.490$ ， $R^2 = 0.9980$ ；选择 IC_{10} 为最低检测限，最低检测限为0.118 ng/mL 。

2.3 样品的检测及与ELISA方法的对比

表1 CLEIA加标回收率

Table 1 Recovery rates of CLEIA for spiked sample

Sudan I 添加量/ (ng/g)	Sudan I 检出量/ (ng/g)	变异系数/%	回收率/%
100	84.19 ± 7.52	8.93	84.19
500	481.93 ± 72.39	15.02	96.39
1 000	1 121.80 ± 99.82	8.89	112.18
2 000	1 501.60 ± 234.37	15.61	75.08

由表1、2可知，CLEIA法测定的加标回收率为75.08%~112.18%，变异系数为8.89%~15.61%。ELISA法测定的加标回收率为94.59%~150.18%，变异系数为5.3%~10.9%。建立的CLEIA法能检测实际样品。

表 2 ELISA加标回收率
Table 2 Recovery rates of ELISA for spiked sample

Sudan I 添加量/ (ng/g)	Sudan I 检出量/ (ng/g)	变异系数/%	回收率/%
100	94.59±5.07	5.3	94.59
500	507.1±55.74	10.9	101.42
1 000	1 501.82±138.75	9.2	150.18
2 000	1 909.1±185.51	9.7	95.45

3 结 论

本实验通过优化包被抗原质量浓度、包被抗原偶联比、抗体稀释比例，建立了间接竞争CLEIA法检测辣椒粉中的Sudan I 的添加量。IC₅₀为0.679 ng/mL，线性范围为0.132~5 ng/mL，最低检测限为0.078 9 ng/mL。包被抗原偶联比对CLEIA方法的IC₅₀影响较小，CLEIA方法的发光强度RLU信号放大倍数优于ELISA方法的吸光度，在相同的低偶联比抗原包被质量浓度条件下，CLEIA方法的IC₅₀较稳定。相同抗原抗体质量浓度条件下，CLEIA法测定的IC₅₀较ELISA方法降低30%左右，相比ELISA方法，CLEIA方法灵敏度较高，检测限低于ELISA方法。测定的辣椒粉中Sudan I 加标回收率为75.08%~112.18%，变异系数为8.89%~15.61%。与ELISA方法对比，变异系数稍大，是由于化学发光方法很灵敏，操作中的各种因素均会对实验结果造成较大影响，回收率较低，可能是Sudan I 吸附性较强，在加标回收过程中损失较大。因此实验操作需要快速和准确，相关实验条件也需进一步优化。综合比较两种方法，CLEIA检测方法具有较好的灵敏度和准确度，符合实际样品中苏丹红大批量检测的需求，可用于相关食品安全污染物和非法添加物的快速高效的检测。

参考文献:

[1] BUDDHADASA S C, MISHRA V, MATTA A K, et al. Measurement of Sudan dyes I, II, III, and IV residues in chili powder[J]. Food Australia, 2007, 59(9): 439-441.

[2] 黄曙海, 庞维群. 苏丹红染料毒性研究及食品中苏丹红检测方法简述[J]. 广西预防医学, 2005, 11(6): 380-383.

[3] FONOVIH T M. Sudan dyes: are they dangerous for human health?[J]. Drug and Chemical Toxicology, 2013, 36(3): 343-352.

[4] 宋雁. 食品中苏丹红的危险性评估[J]. 国外医学: 卫生学分册, 2005, 32(3): 129-132.

[5] ZHOU Min, CHEN Xiaofeng, XU Yinyin, et al. Sensitive determination of Sudan dyes in foodstuffs by Mn-ZnS quantum dots[J]. Dyes and Pigments, 2013, 99(1): 120-126.

[6] ZHU Yonghong, ZHAO Bo, XIAO Ruiqi, et al. Simultaneous determination of 14 oil-soluble synthetic dyes in chilli products by high performance liquid chromatography with a gel permeation chromatography clean-up procedure[J]. Food Chemistry, 2014, 145(15): 956-962.

[7] ZHANG Jing, WANG Meiling, CHAO Shentu, et al. Electrochemical detection of Sudan I by using an expanded graphite paste electrode[J]. Journal of Electroanalytical Chemistry, 2012, 685(1): 47-52.

[8] YANG Qinyan, SUN Qian, ZHOU Tianshu, et al. Determination of parathion in vegetables by electrochemical sensor based on molecularly imprinted polyethyleneimine/silica gel films[J]. Journal of Agricultural and Food Chemistry, 2009, 57(15): 6558-6563.

[9] XIAO Fei, ZHANG Ningdan, GU Hongjie, et al. A monoclonal antibody-based immunosensor for detection of Sudan I using electrochemical impedance spectroscopy[J]. Talanta, 2011, 84(1): 204-211.

[10] ATES E, MITTENDORF K, SENYUVA H. LC/MS method using cloud point extraction for the determination of permitted and illegal food colors in liquid, semiliquid, and solid food matrixes: single-laboratory validation[J]. Journal of AOAC International, 2011, 94(6): 1853-1862.

[11] CHEN D, LI X, TAO Y, et al. Development of a liquid chromatography-tandem mass spectrometry with ultrasound-assisted extraction method for the simultaneous determination of sudan dyes and their metabolites in the edible tissues and eggs of food-producing animals[J]. Journal of Chromatography Analytical Technologies in the Biomedical and Life Sciences, 2013, 939(15): 45-50.

[12] LIU Rongyuan, HEI Wenjing, HE Pingli, et al. Simultaneous determination of fifteen illegal dyes in animal feeds and poultry products by ultra-high performance liquid chromatography tandem mass spectrometry[J]. Journal of Chromatography B, 2011, 879(24): 2416-2422.

[13] 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.

[14] CORNET V, GOVAERT Y, MOENS G, et al. Development of a fast analytical method for the determination of sudan dyes in chili- and curry-containing foodstuffs by high-performance liquid chromatography-photodiode array detection[J]. Journal of Agricultural and Food Chemistry, 2006, 54(3): 639-644.

[15] SCHUMMER C, SASSEL J, BONENBERGER P, et al. Low-level detections of Sudan I, II, III, and IV in spices and chili-containing foodstuffs using UPLC-ESI-MS/MS[J]. Journal of Agricultural and Food Chemistry, 2013, 61(9): 2284-2289.

[16] 张玮玮, 刘玲玲, 武彦文. 食用天然辣椒红色素中掺杂苏丹红的红外光谱快速识别[J]. 光谱学与光谱分析, 2012, 32(4): 958-961.

[17] HAN Dan, YU Meng, KNOPP D, et al. Development of a highly sensitive and specific enzyme-linked immunosorbent assay for detection of Sudan I in food samples[J]. Journal of Agricultural and Food Chemistry, 2007, 55(16): 6424-6430.

[18] 何方洋. 苏丹红残留酶联免疫检测技术研究[J]. 食品研究与开发, 2009, 30(6): 139-143.

[19] VDOVENKO M M, ZUBKOV A V, KUZNETSOVA G I. Development of ultrasensitive soybean peroxidase-based CL-ELISA for determination of human thyroglobulin[J]. Luminescence, 2010, 25(2): 110-111.

[20] SUN J W, ZHANG Y, WANG S. Development of chemiluminescence enzyme-linked immunosorbent assay for the screening of metolcarb and carbaryl in orange juice, cabbage and cucumber[J]. Food Additives and Contaminants, 2010, 27(3): 338-346.

[21] ZHANG Suxia, ZHANG Zhen, SHI Weimin, et al. Development of a chemiluminescent ELISA for determining chloramphenicol in chicken muscle[J]. Journal of Agricultural and Food Chemistry, 2006, 54(16): 5718-5722.

[22] 徐晓婴, 卢庆鋈, 徐艳力, 等. 化学发光酶免疫法检测盐酸克伦特罗残留[J]. 上海交通大学学报, 2009, 27(2): 126-128.

[23] 赵丽霞, 李振甲, 魏彦林, 等. 化学发光免疫分析[J]. 世界科技研究与发展, 2004, 26(4): 24-33.

[24] 孟玮, 刘仁荣, 裴雪梅, 等. 苏丹红 I 结构类似物合成及其人工抗原的制备研究[J]. 食品科学, 2009, 30(20): 169-172.