

文章编号:1673-1689(2009)06-0791-04

苏丹红 I 酶联免疫吸附检测方法的建立

涂顺, 裘雪梅, 谢少霞, 吴前辉, 刘仁荣*

(江西科技师范学院 生命科学学院, 江西南昌 330013)

摘要:应用抗苏丹红 I 单克隆抗体 12D8 建立了间接竞争 ELISA 方法,用于检测辣椒粉中的苏丹红 I,最低检出限为 4.22 ng/mL,检测范围为 7.8~125 ng/mL。用体积分数 70% 甲醇水溶液提取辣椒粉中的苏丹红 I(80~4 000 ng/g),回收率为 52.3%~110%,变异系数为 3.2%~8.9%。

关键词:苏丹红 I;酶联免疫吸附试验(ELISA);检测;单克隆抗体

中图分类号:TQ 610.7

文献标识码:A

Enzyme Linked Immunosorbent Assay for the Detection of Sudan I

TU Shun, QIU Xue-mei, XIE Shao-xia, WU Qian-hui, LIU Ren-rong*

(Life Science Institute, Jiangxi Science & Technology Normal University, Nanchang 330013, China)

Abstract:A fast and reliable Sudan I determine method with ELISA and anti-Sudan I McAb 12D8 was developed in this study. It was found that the determination limitation was 4.22 ng/mL and the linear range of the inhibition curve was 7.8–125 ng/mL, respectively. In the detection of the samples of mixed chilli powder with Sudan I (80~4000 ng/g), extracted with methanol:water (70:30, v/v), the recovery rate of Sudan I in the samples ranged from 52.3% to 110%, and the coefficients of variation was 3.2% to 8.9%.

Key words: Sudan I ; ELISA; detection; monoclonal antibody

苏丹红 I(Sudan I)是一种人工合成的红色亲脂性偶氮化合物,化学名称为 1-苯基偶氮-2-萘酚。苏丹红 I 常作为工业染料,被广泛用于如溶剂、油和蜡的增色以及鞋、地板等增光方面。许多实验证明:苏丹红 I 及其代谢产物可与 DNA 生成加合物,是一种潜在的致癌剂^[1-3],可引起肝脏、膀胱和脾脏等脏器的肿瘤^[4-5]。因此,国际癌症研究机构(International Agency for Research on Cancer, IARC)将苏丹红 I 归为三类致癌物。另外,苏丹红 I 还具有致敏性和遗传毒性^[6-7]。目前,苏丹红的检测方法

主要有液质联用法和高效液相色谱法^[8-9],尽管液质联用和高效液相色谱法等仪器分析方法可以精确地进行定量分析,但是由于其设备昂贵、操作复杂和对样品的纯度有较高的要求,导致检测成本高、周期长,只能用于小批量样本抽检,无法满足食品安全检测中对大批量样本快速筛查的需要。而免疫化学方法由于具有较高的灵敏度和特异性,对样品的纯度要求不高,特别适合于大批量样本的检测^[10]。国内韩丹^[11]等用人工合成抗原免疫家兔制备得到多克隆抗体并建立了间接竞争酶联免疫法

收稿日期:2009-01-06

基金项目:江西科技师范学院博士科研启动基金、大学生科研创业项目。

* 通讯作者:刘仁荣(1969-),男,江西南昌人,工学博士,教授,主要从事食品科学研究。Email:lilirenrong@hotmail.com

检测辣椒粉等中的苏丹红 I 号,测得检出限为 0.12 $\mu\text{g/L}$, IC_{50} 值(标准曲线中吸光度抑制至最大吸光度值的 50% 时所对应的待测物浓度)为 0.74 $\mu\text{g/L}$ 。作者成功地制备了较高亲和力和特异性的单克隆抗体,并在此基础上建立了间接竞争酶联免疫法,该方法可用于检测辣椒粉中的苏丹红 I 号。

1 材料与方 法

1.1 试剂与仪器

苏丹红 I, 苏丹红 II, 苏丹红 III, 苏丹红 IV 羊抗鼠 IgG-HRP, 牛血清白蛋白(bovine serum albumen BSA), 降植烷(pristane); 均购自 sigma 公司; 其余试剂均为国产分析纯; 苏丹红 I 人工抗原, 抗苏丹红 I 单克隆抗体 12D8; 作者所在实验室自制; 96 孔酶标板; 美国 Costar 公司产品; 酶标仪; 美国 Thermo 公司产品。

1.2 实验方法

1.2.1 Sudan I 检测抗原的制备 称取 α -萘酚 78 mg, 溶于 0.5 mL 3 mol/L 的 NaOH 中, 冰浴; 称取 60 mg 对氨基苯胺酸溶于 0.75 mL 4 mol/L 的 HCl, 完全溶解后, 冰浴 15~30 min, 加入 40 mg NaNO_2 , 冰浴反应并摇匀, 5 min 后, 逐滴加入 α -萘酚中, 冰浴反应 15 min; 5 000 r/min 离心取沉淀, 冰水洗两次, 风干, 在乙醇中重结晶, 取结晶物 1.5 mg 溶解于 1 mL 四氢呋喃(THF)中, 加入 NHS 1.0 mg 和 DCC 2.0 mg, 置室温避光振荡反应 24 h。待反应完全后, 停止反应, 10 000 r/min 离心 10 min 去沉淀。上清液真空抽干, 沉淀溶解于 2 mL 二甲基亚砜(DMSO)中, 缓慢滴入 BSA 溶液中(15 mg 溶于 5 mL 0.13 mol/L NaHCO_3)。室温下振荡反应 4 h, 反应结束后, 0.01 mol/L PBS 4 $^{\circ}\text{C}$ 透析 72 h, 得到苏丹红 I 检测抗原。

1.2.2 单克隆抗体的制备与纯化 将杂交瘤细胞接种于提前接种降植烷的 BALB/c 小鼠腹腔制备腹水, 取新鲜采集的腹水(或冻存的腹水), 2 000 r/min 离心 15 min, 除去细胞成分(或冻存过程中形成的固体物质)等。取上层清亮的腹水, 等量加入 PBS。用 0.44 μm 的微孔滤膜过滤腹水, 以除去较大的凝块及脂肪滴, 用 10 000 g 15 min 高速离心(4 $^{\circ}\text{C}$)除去细胞残渣及小颗粒物质。按每毫升稀释腹水加 11 μL 辛酸的比例, 16~22 $^{\circ}\text{C}$ 搅拌下逐滴加入辛酸, 于 30 min 内加完, 4 $^{\circ}\text{C}$ 静置 2 h。15 000 g 离心 30 min, 弃沉淀; 上清经尼龙筛过滤(125 μm), 加入 1/10 体积的 0.01 mol/L PBS, 用 1 mol/L NaOH 调 pH 值至 7.2; 在 4 $^{\circ}\text{C}$ 下加入饱和硫酸铵

至 4.5% 饱和度, 作用 30 min, 静置 1 h; 10 000 g 离心 30 min, 弃上清; 沉淀溶于适量 PBS 中, 对 50~100 倍体积的 PBS 透析, 4 $^{\circ}\text{C}$ 过夜, 其间换液 3 次以上。

1.2.3 检测抗原和单克隆抗体工作浓度的确定 将苏丹红 I 检测抗原(BSA-Sudan I)用碳酸钠-碳酸氢钠缓冲液(pH 9.6)分别稀释为 1、2、4、6、8 $\mu\text{g/mL}$, 4 $^{\circ}\text{C}$ 包被过夜, 体积分数 3% 脱脂牛奶封闭后用 PBST 洗涤 4 次用抗 Sudan I 单克隆抗体 12D8 分别进行倍比稀释, 进行方阵滴定, 确定进行 ELISA 实验时检测抗原的包被浓度、单克隆抗体的工作浓度。

1.2.4 标准曲线的建立 间接竞争酶联免疫吸附分析方法的建立, 根据确定的最佳的抗原包被浓度、抗体和酶标二抗工作浓度建立苏丹红 I 间接竞争 ELISA 的标准曲线。用 pH=9.6 的碳酸盐缓冲液将苏丹红 I 人工抗原(BSA-Sudan I)稀释至 2.0 $\mu\text{g/mL}$, 包被酶标板, 100 $\mu\text{L/孔}$, 4 $^{\circ}\text{C}$ 包被过夜, 弃去包被液后加入体积分数 3% 脱脂乳, 37 $^{\circ}\text{C}$ 封闭 1 h, PBST 洗板 4 次; 加入体积分数 35% 甲醇水稀释的苏丹红 I 标准品 50 μL (质量浓度分为 1 000、500、250、125、62.5、31.25、15.625、7.812 5、0 ng/mL), 同时加入 50 μL 稀释的单克隆抗体 12D8, 37 $^{\circ}\text{C}$ 温育 40 min, PBST 洗板 4 次; 加入 1:1 000 稀释的羊抗鼠 IgG-HRP, 100 $\mu\text{L/孔}$, 37 $^{\circ}\text{C}$ 40 min, PBST 洗板 4 次; 加入四甲基联苯胺(TMB)显色, 100 $\mu\text{L/孔}$, 37 $^{\circ}\text{C}$ 避光显色 10 min, 取出加 50 μL 2 mol/L 硫酸终止反应, 酶标仪测定吸光度 $A(A_{450\text{nm}})$, 计算结合率(结合率 = $B/B_0 \times 100\%$, B_0 为不加苏丹红 I 的 A 值, B 为加苏丹红 I 的 A 值), 并绘制标准曲线, 最低检测下限由 20 个零值的平均值加上 3 倍标准差算得。

1.2.5 交叉反应率的测定 用体积分数 35% 甲醇水溶解不同质量浓度的苏丹红 I, 苏丹红 II, 苏丹红 III 和苏丹红 IV 标准品, 取 50 μL 进行竞争 ELISA 测定, 计算交叉反应率(交叉反应率 = 结合率为 50% 时苏丹红 I 质量浓度/结合率为 50% 时近似抗原物质的质量浓度 $\times 100\%$)。

1.2.6 加标回收率测定 红辣椒购于超市, 搅拌机搅碎成辣椒粉末, 称取辣椒粉 1 g(精确到 0.01 g), 向其中加入 10 mL 含不同质量浓度苏丹红 I 的体积分数 70% 甲醇水溶液, 使苏丹红 I 在样品中的质量分数分别为 4 000、2 000、1 000、500、200、80 ng/g, 充分振荡 5 min, 4 000 r/min 离心 5 min, 取上清液再用蒸馏水稀释 2 倍进行 ELISA 测定, 计算加标回收率。

2 实验结果

2.1 检测抗原的制备结果

从苏丹红检测抗原的紫外扫描图(图 1)可见,苏丹红 I 与 BSA 的偶联产物出现了苏丹红 I 标准品与 BSA 的叠加峰,且出现了红移现象,证明苏丹红检测抗原制备成功,根据其在 280 nm 和 486 nm 的吸光度 A、苏丹红 I 和 BSA 在这二种波长下的摩尔消光系数,按公式 $C_{SudanI}/C_{BSA} = (A_{280} \times K_{BSA,486} - A_{486} \times K_{BSA,280}) / (A_{280} \times K_{SudanI,280} - A_{486} \times K_{SudanI,486})$ (注: C_{SudanI}/C_{BSA} 为苏丹红 I 人工抗原偶联比, A_{280} 、 A_{486} 为其在波长 280 nm 和 486 nm 的吸光度, $K_{BSA,486}$ 、 $K_{BSA,280}$ 、 $K_{SudanI,280}$ 、和 $K_{SudanI,486}$ 为 BSA 和苏丹红 I 在这二种波长下的摩尔消光系数)分析测定偶联产物的摩尔比 9 : 1。

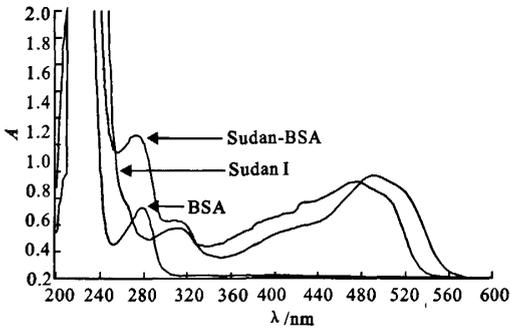


图 1 苏丹红 I 人检测抗原紫外扫描图
Fig. 1 UV spectrum of Sudan I conjugate

2.2 单克隆抗体的制备结果

将降植烷通过腹腔注射到 6~8 周龄 BALB/c 小鼠体内,每只约 0.3 mL。一周后腹腔注入杂交瘤细胞,5 d 后开始每天观察小鼠腹水产生情况,如果腹部明显膨大,以手触摸时,皮肤有紧张感,即用 16 号针头采集腹水。并按照 1.2.2 所述辛酸-硫酸铵法纯化腹水,纯化后,腹水效价基本不变。

2.3 检测抗原和单克隆抗体浓度的确定

经方阵滴定确定苏丹红人工抗原(BSA-Sudan I)的包被质量浓度为 2.0 μg/mL, 100 μL/孔, 4 °C 包被过夜;抗 Sudan I 单克隆抗体 12D8 的工作终浓度为 1 : 32 000,羊抗鼠 IgG- HRP 工作浓度为 1 : 1 000。

2.4 Sudan I-ELISA 标准曲线

苏丹红 I 间接竞争标准曲线见下图 2。检测范围为 7.8·125 ng/mL, IC₅₀ 为 26 ng/mL,检测限为 4.22 ng/mL。

2.5 交叉反应率测定结果

分别将苏丹红 I, II, III, IV 号用体积分数 35%

甲醇水溶液稀释成不同浓度,间接竞争法测得结果如下图 3 所示,表 1 为抗苏丹红 I 单克隆抗体的交叉反应率。

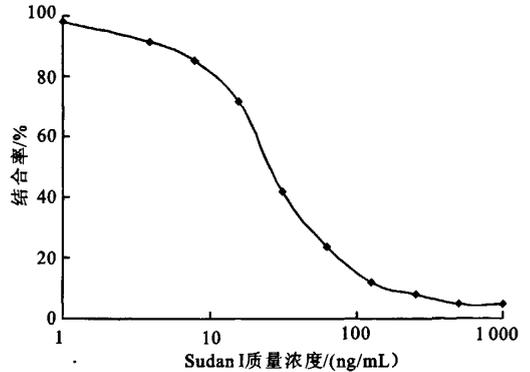


图 2 抗苏丹红 I 单克隆抗体 12D8 的间接竞争抑制曲线

Fig. 2 Standard curve of competitive ELISA of anti-Sudan I McAb 12D8

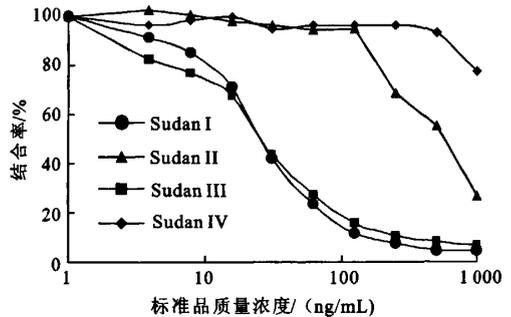


图 3 单克隆抗体 12D8 的交叉反应率

Fig. 3 Cross reactivity of anti-Sudan I McAb 12D8

表 1 单克隆抗体的交叉反应率
Tab. 1 Cross reactivity of anti-Sudan I McAb 12D8

反应标准品	交叉反应率/%
Sudan I	100
Sudan II	12
Sudan III	97
Sudan IV	7.2

2.6 加标回收率检测结果

将添加有不同量苏丹红 I 标准品的辣椒粉样品经体积分数为 70% 甲醇水溶液提取,用建立的竞争间接 ELISA 方法检测 Sudan I 含量,测得辣椒粉样品中苏丹红 I 的回收率为 52.3%~110%,变异系数为 3.2%~8.9%。结果如表 2 所示。

表2 苏丹红 I 加标回收率的测定结果

Tab. 2 The rate of recovery by ELISA of Sudan I in the chili powder sample

苏丹红 I 添加量/ (ng/g)	苏丹红 I 平均检出值/ (ng/g)	苏丹红 I 平均加标回收率/%	变异系数 (n=4)/ %
4 000	2 091	52.3	6.1
2 000	1 556	77.8	4.4
1 000	768	76.8	5.5
500	454	90.8	3.2
200	193.4	96.7	8.9
80	88.1	110	4.4

3 讨论

应用作者所在实验室研制的抗苏丹红 I (Sudan I) 单克隆抗体建立了苏丹红 I 的间接竞争 ELISA 检测方法, 检测范围为 7.8~125 ng/mL, IC_{50} 为 26 ng/mL, 加标回收率为 52.3%~110%, 变异系数为 3.2%~8.9%。建立的竞争间接 ELISA 方法检测辣椒粉样品的工作条件为: 苏丹红 I 人工抗原包被质量浓度为 2 μ g/mL; 抗苏丹红 I 单克隆抗体工作终浓度为 1:32 000; 用 10 倍体积的体积分数 70%

甲醇水溶液充分振荡 5 min 提取样品中的苏丹红用于检测。作者在成功制备了抗苏丹红 I 单克隆抗体的基础上, 构建了此简便易行且快速检测辣椒粉等中苏丹红 I, III 号的方法。在建立方法的过程中, 分别选用不同体积分数的乙腈-水和甲醇-水溶液作为样品提取液, 当选用乙腈提取时, 低体积分数的乙腈提取时回收率很低, 但当提高乙腈体积分数后, 回收率均超过 100%, 甚至达到 200%。笔者认为这是由于辣椒粉中色素在乙腈中的溶解度力大大高于苏丹红 I 在乙腈中的溶解度, 故当低体积分数的乙腈作为提取液时, 乙腈里溶解了大部分辣椒里的色素, 造成回收率偏低, 当提高乙腈体积分数时, 由于乙腈对色素溶解力很高, 又对实验造成相当大的干扰。而采用一定体积分数的甲醇-水溶液可降低基质干扰, 同时也能达到令人满意的提取效果。作者从合成苏丹红人工抗原出发, 通过杂交瘤细胞技术制备了高亲和力和特异性的单克隆抗体, 并在此基础上建立了苏丹红 I 的间接竞争 ELISA 法, 本方法操作简便, 样品处理简单快速, 具备快速筛查的特点, 可用于检测辣椒粉等中的苏丹红 I, III 号, 具有较好的应用前景。

参考文献 (References):

- [1] Stiborova M, Schmeiser HH, Frei E. Prostaglandin H synthase-mediated oxidation and binding to DNA of a detoxication metabolite of carcinogenic Sudan I, 1-(phenylazo)-2,6-dihydroxynaphthalene[J]. *Cancer Letters*, 1999, 146(1):53-60.
- [2] Stiborova M, Asfaw B, Frei E, et al. Benzenediazonium ion derived from Sudan I forms an 8-(phenylazo) guanine adduct in DNA[J]. *Chemical Research Toxicology*, 1995, 8(4):489-498.
- [3] Haiyan Xu, Thomas M. Heinze, et al. Anaerobic metabolism of 1-amino-2-naphthol-based azo dyes anaerobic metabolism of 1-amino-2-naphthol-based azo dyes (sudan dyes) by human intestinal microflora[J]. *Applied and Environmental Microbiology*, 2007, 73(23):7759-7762.
- [4] Stiborova M, Martinek V, Rydlova H, et al. Sudan I is a potential carcinogen for humans: evidence for its metabolic activation and detoxication by human recombinant cytochrome P450 1A1 and liver microsomes[J]. *Cancer Research*, 2002, 62(20):5678-84.
- [5] Stiborova M, Asfaw B, Anzenbacher P, et al. A new way to carcinogenicity of azo dyes: the benzenediazonium ion formed from a non-aminoazo dye, 1-phenylazo-2-hydroxynaphthalene (Sudan I) by microsomal enzymes binds to deoxyguanosine residues of DNA[J]. *Cancer Letters*, 1988 40:327-333.
- [6] Lubet RA, Connolly G, Kouri RE, et al. Biological effects of the Sudan dyes[J]. *Biochem Pharmacol*, 1983, 32:3053-3058.
- [7] Chung KT. The significance of azo-reduction in the mutagenesis and carcinogenesis of azo dyes[J]. *Mutat Res*, 1983, 114:269-281.
- [8] GB/T 19681-2005, 食品中苏丹红染料的检测方法——高效液相色谱法[S].
- [9] 张翠英, 蔡少青, 王雪芹. LC/MS/MS 法分析食品中微量苏丹红 I、II、III、IV[J]. *中国卫生检验杂志*, 2007, 17(9):1547-1548.
ZHANG Cui-ying, CAI Shao-qing, WANG Xue-qin, et al. Detection of Sudan I, Sudan II, Sudan III and Sudan IV in food stuffs by ultra performance liquid chromatography - tandem mass spectrometry[J]. *Chinese Journal of Health Laboratory Technology*, 2007, 17 (9):1547-1548. (in Chinese)
- [10] 林影, 叶茂, 韩双艳, 等. 免疫分析研究进[J]. *食品与生物技术学报*, 2007, 4:117-120.
LIN Ying, YE Mao, HAN Shuang-yan, et al. The Progress on the Research of Immunoassay[J]. *Journal of Food Science and Biotechnology*, 2007, 4:117-120. (in Chinese)
- [11] 韩丹, 于梦, 吴梅, 等. 酶联免疫吸附分析法测定食品中的苏丹红 I 号[J]. *分析化学*, 2007, 35(8):1168-1170.
HAN Dan, YU Meng, WU Meng, et al. Development of a highly sensitive and specific nzyme-linked immunosorbent assay for detection of sudan I in food samples [J]. *Chinese Journal of Analytical Chemistry*, 2007, 35(8):1168-1170. (in Chinese)

(责任编辑:朱明)