

等食品碘含量较高,其中鸡蛋、海带的碘含量均超过了1 mg/100g。猪肉、猪肝、非洲鲫、番石榴、香菜等食品的碘含量均低于0.4 mg/100g。

2.5.2 食盐含碘量(表5)

表5 各类食盐的含碘量(mg/kg)

盐种类	含量
加碘精制盐	38.96
加碘粗制盐	31.44
加碘低钠健康盐	34.41
无碘盐	0.00

3 讨论

微量碘的测定方法目前已有容量法、目视比色法、甲基橙氧化褪色光度法、间接测定光度法、碘-四氯化萃取光度法、碘-有机溶剂比色法、碘(I⁻)-催化还原-动力学分光光度法、滴定法,其他还有电化学分析方法及离子色谱等方法测定碘含量等。本文采用放大反应比色法,待测液中1mol I⁻最终变成3mol I₂,再与淀粉发生显色反应,这个过程中I⁻被放大了6倍,从而提高了分析的灵敏度。另外本法用碱性酚钠试剂十分巧妙地去除了溶液中过量的Br₂,一方面避免了煮沸去除Br₂的不彻底和对环境的污染,另一方面又可防止用强还原剂去除Br₂时引起IO₃⁻还原而使分析结果偏低,方法的变异系数为0.64%~

3.32%,回收率达到为96%~104%,检出限量为3.4 μg/g,仪器设备大众化,条件要求不高,值得推广。

本研究进一步表明海带、海鱼、海虾和贝类等海产品含碘量高,肉类食品中的碘含量都比较低。但是鸡肉的含碘量是其它肉类的3倍,基本和含碘丰富的海带相同。造成鸡肉含量高的原因是否与鸡饲料含碘较高有关?有待对其作进一步的监测。建议有关部门加强对食用鸡饲养过程中管理和监控,规范生产过程,严格按照国家标准控制鸡饲料中碘的含量。某些蔬菜类含碘量较高,可能与沿海地区种植条件有关。

按《食盐加碘消除碘缺乏危害管理条例》^[2]规定,食盐加工工厂出厂盐碘浓度不得低于40mg/kg,销售部门不得低于30mg/kg,用户不得低于20 mg/kg。本研究测得市售碘盐含碘量为(35±5)mg/kg,符合国家食盐加碘消除碘缺乏危害管理条例。如果按我国现行的膳食指南,成年人每日食盐摄入量不超过6g,每天从加碘食盐中可获得碘达210 μg,足以满足人体的生理需要。

参考文献

- 汪建飞,段立珍,刘乃会.放大反应比色法测定土壤中微量碘.分析试验室,1999(18):71~74.
- 中华人民共和国国务院令第163号发布.食盐加碘消除碘缺乏危害管理条例,1994.

应用 ELISA 定量检测转基因玉米中 Bt1 蛋白的研究

刘光明 苏文金 厦门大学生命科学学院 厦门 361005

刘光明 厦门出入境检验检疫局

苏文金 陈向峰 集美大学生物工程学院

摘要 应用纯化的Bt1杀虫晶体蛋白作为标准蛋白和免疫抗原,通过抗体-抗原-酶标抗体反应,建立了酶联免疫吸附测定法(ELISA),以定量检测转基因玉米中的Bt1表达蛋白。用建立的ELISA法对4种进口玉米产品进行了测定,实验结果得到了免疫印迹分析的验证,并与进口试剂盒方法的定量分析结果相一致,因而建立的ELISA法具有操作简便、快速特异、定量准确、经济实惠的优点,特别适合于大批量检测,有着良好的应用前景。

关键词 转基因玉米 Bt1蛋白 ELISA检测

厦门科技计划资助项目(350222001109)

Abstract Based on the antibody-antigen-enzyme antibody reaction and by using purified Bt1 insecticidal crystal protein as both standard protein and immunity antigen, a quantitative enzyme-linked immunosorbent assay (ELISA) method was established to detect express Bt1 protein in genetically modified maize. 4 imported maize samples were determined by ELISA. In comparison with the western-blotting & KIT assay method, the results were almost identical. It concluded that the ELISA method might be useful for easy, rapid, reliable and effective assay in large samples.

Key words Genetically modified maize Bt1 protein ELISA detection

优良的农艺性状和巨大的经济效益使转基因农作物的商品化种植迅速发展,全世界转基因作物种植总面积由1996年的170万公顷增加到2001年的5260万公顷。2001年种植面积最大的是转基因大豆,达3330万公顷,占种植总面积的63%,种植面积居第二位的是转基因玉米,达980万公顷,占种植总面积的19%^[1]。

随着转基因生物的商品化发展,转基因产品的潜在生态风险及对人体健康影响的争论也日趋激烈。转基因产品是否对人类无毒、无副作用,是否与非转基因产品“实质等同”、无显著差异;转基因生物是否会对环境造成灾难等。这些担忧不仅来源于转基因技术的不成熟及其产品品质安全的不确定性,更是由于转基因技术对人类社会经济影响的不可预见性。这需要大量的实践和较长时间来证明。因此,目前世界上大多数国家主张对转基因产品加贴标签,以保护消费者对产品是否含转基因成分的知情权;生物多样性公约缔约国于2001年1月经谈判通过了《生物安全议定书》,确认了预先防范原则,允许各国采取措施限制或禁止进口活的转基因产品。我国也于2002年1月5日发布了《农业转基因生物安全评价管理办法》,并于2002年3月20日正式开始实施。

为了能够对转基因作物及食品做出综合评价,除了需要各国政府和国际机构制定科学的安全评价体系以及严格的法律法规外,建立合适的方法对转基因产品进行检测也很重要。目前转基因产品的检测主要有PCR(聚合酶链式反应)和ELISA(酶联免疫吸附测定)等方法^[2]。PCR检测法是将样品中提取的DNA作为模板,使微量、特定的目标DNA片段在几个小时内迅速扩增到百万倍,因而具有灵敏度高和快速的优点。ELISA检测法是一种利用免疫学原理检测抗原或抗体的技术,在生物医学等领域已得到了广泛应用。ELISA方法检测外源基因表达蛋白的灵敏度高于0.1%^[3],并且具有可定量分析和操作简单的优点,因此ELISA方法成为转基因产品的检测研究中不可缺少的方法。

1 材料和方法

1.1 材料

1.1.1 试验材料

由厦门口岸入境的来自美国、加拿大等国的进口玉米随机样;Bt1玉米标准样品购自美国SDI公司;Bt1晶体蛋白由北京大学生命科学学院许崇仁教授提供;新西兰大白兔购自厦门市

药品检验所。

1.1.2 主要仪器与试剂

BIO-RAD Model-450型酶标仪, Sigma 2K15离心机, CARY 3E紫外分光光度计、国产电动粉碎机; Bt玉米检测试剂盒购自美国SDI公司; PVDF膜购自Promega公司; 邻苯二胺、BSA等其它试剂为进口或国产分析纯试剂。

1.2 方法

1.2.1 Bt1晶体蛋白碱溶解液的制备^[4]

称取Bt1晶体蛋白10mg,加入5ml 0.2mol/L PBS缓冲液(pH7.5),悬浮30min, 1000r/min离心15min,吸取上清液;沉淀用3ml PBS同样悬浮、离心、吸取上清液;沉淀用2ml PBS同样悬浮、离心、吸取上清液;将3次上清液混合后于5000r/min离心30min,弃上清液,沉淀用3ml 0.1mol/L NaOH溶解1.5h,其间多次搅拌;5000r/min离心20min,吸取上层液用pH2.0盐酸调至pH7.0,用生理盐水定容至5ml即为Bt1晶体蛋白碱溶解液;浓度测定采用紫外分光光度法。

1.2.2 Bt1抗体的制备

将1ml Bt1晶体蛋白碱溶解液(约0.2mg)与等量福氏完全佐剂混合、乳化,多点皮内注射免疫大白兔;然后用福氏不完全佐剂代替完全佐剂,分别于7、14和30d强化免疫;用琼脂糖双扩散法测定效价达1:100以上时,采血获兔抗Bt1蛋白血清,并用硫酸铵盐析法纯化抗体^[5]。

1.2.3 ELISA检测玉米的Bt1蛋白方法的建立

1.2.3.1 缓冲液的配制

KH_2PO_4 0.02g, NaCl 0.8g, KCl 0.02g, Na_2HPO_4 0.14g, BSA 0.5g, 0.5ml Tween-20, 用蒸馏水定容至100ml即为PBST缓冲液; Na_2CO_3 1.33g, NaCl 1.46g, VC 0.5g, 加入250ml蒸馏水即为样品提取液; BSA 0.3g溶于10ml PBST缓冲液即为封闭剂; NaCl 4.0g, KH_2PO_4 0.1g, $\text{Na}_2\text{HPO}_4 \cdot 12\text{H}_2\text{O}$ 1.48g, 0.5ml Tween-20, 加入蒸馏水500ml即为洗涤液; NaCl 4.0g, KH_2PO_4 0.1g, $\text{Na}_2\text{HPO}_4 \cdot 12\text{H}_2\text{O}$ 1.48g, 白明胶0.5g, 0.5ml Tween-20, 加入蒸馏水500ml即为抗体稀释液; $\text{C}_6\text{H}_8\text{O}_7$ 2.55g, $\text{Na}_2\text{HPO}_4 \cdot 12\text{H}_2\text{O}$ 9.215g, 0.5ml Tween-20, 加入蒸馏水500ml即为底物缓冲液; 邻苯二胺0.01g, 4ml底物缓冲液, 加入2 μl 30% H_2O_2 即为底物溶液(现配现用); 2mol/L H_2SO_4 即为终止液。

1.2.3.2 Bt1蛋白标准溶液的配制

将Bt1晶体蛋白碱溶解液用PBST缓冲液稀释成浓度为

10 μg/ml, 然后依次2倍稀释成10个浓度梯度(包括0 μg/ml)。

1.2.3.3 待测样品蛋白的提取

将样品用粉碎机磨碎成粉状后, 从中称取1.0g于10ml试管中, 加入5ml 样品提取液, 充分摇匀后于4℃ 放置4h或过夜, 5000r/min离心15min, 吸取上清液。

1.2.3.4 ELISA测定

在酶标板孔中加入Bt1蛋白标准和待测样品(100 μl/孔), 每个样品重复三次; 将酶标板放入湿盒中, 37℃ 包被3h; 加入封闭剂(100 μl/孔), 37℃ 温育30min; 取出晾干, 加入洗涤液(150 μl/孔), 放置1min, 甩掉洗涤液并吸干, 重复洗涤4次; 加入用抗体稀释液1:500稀释的抗体(100 μl/孔) 湿盒中37℃ 温育30min; 洗板同上; 加入用抗体稀释液1:1000稀释的酶标二抗(100 μl/孔), 湿盒中37℃ 温育30min; 洗板同上; 加入现配的底物溶液(100 μl/孔), 湿盒中37℃ 温育15min; 加入2mol/L H₂SO₄ 终止反应(50 μl/孔); 酶标仪测定样品的OD₄₉₂值。

1.2.4 试剂盒法检测玉米的Bt1蛋白

称取0.2g粉状样品于1.5ml管中, 加入1ml 提取液, 充分振荡5min, 室温静置30min, 5000r/min离心5min, 吸取上清液即为样品蛋白; 向酶联板孔中加入结合液(100 μl/孔); 再分别加入0%, 0.15%, 0.5%, 2.0%的Bt1玉米标准样品和待测样品(100 μl/孔), 每个样品重复三次, 覆盖封口膜, 轻击酶联板30s混匀, 室温放置1h; 加入洗涤液(300 μl/孔), 重复洗涤5次; 加入显色液(100 μl/孔) 轻击酶联板30s混匀, 室温放置10min; 加入终止液(100 μl/孔), 酶标仪测定样品的OD₄₅₀值。

1.2.5 应用建立的ELISA方法对实物进行定量检测分析

应用建立的ELISA方法对4份实物样品进行检测, 并设立无菌双蒸水(空白)、非转基因样品(阴性)和Bt1 玉米标准样品(阳性)三份对照。

1.2.6 Bt1蛋白的免疫印迹分析

参照《分子克隆实验指南》^[5] 应用制备的Bt1抗体对Bt1玉米标准(2%)和玉米1号样品进行免疫印迹分析。

2 结果

2.1 ELISA检测Bt1晶体蛋白的结果

将酶标仪测定的浓度梯度Bt1蛋白标准溶液的ELISA结果列成表1, 由表1可见, Bt1蛋白的最低可检值为0.312 μg/ml,

随着标准品的浓度由高至低成倍稀释, 其ELISA检测的OD₄₉₂值也呈梯度递减。以标准溶液Bt1蛋白含量为横坐标, 以相应的OD₄₉₂值为纵坐标, 得到ELISA检测Bt1蛋白的浓度标准曲线(图1), 结果表明标准溶液Bt1蛋白含量与相应的OD值之间有良好的线性关系。

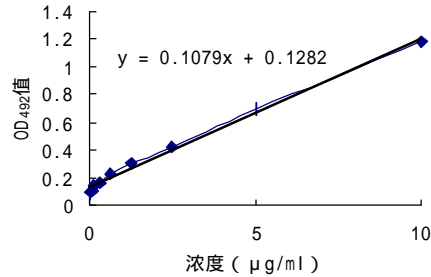


图1 ELISA检测Bt1蛋白的浓度标准曲线

2.2 ELISA法和试剂盒法检测标准样品Bt1蛋白的结果

Bt1玉米检测试剂盒中4个标准样品的百分比含量分别是2%、0.5%、0.15%、0%, 将酶标仪测定的ELISA法/试剂盒法的结果列成表2。由表2可见, ELISA法对Bt1蛋白的最低可检值为0.15% 随着标准样品的百分比含量由低至高成倍增长, 其相应的OD₄₉₂值/OD₄₅₀值也呈梯度上升。以标准样品Bt1蛋白百分比含量为横坐标, 以相应的OD₄₉₂值为纵坐标, 得到ELISA法检测Bt1蛋白的百分比含量标准曲线(图2), 结果表明标准样品Bt1蛋白百分比含量与相应的OD₄₉₂值之间有良好的线性关系。

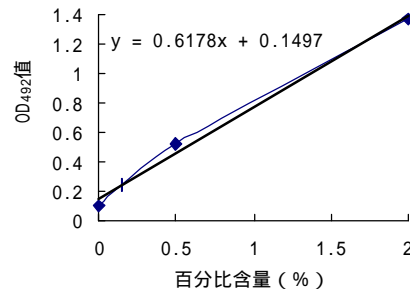


图2 ELISA法检测Bt1蛋白的百分比含量标准曲线

表1 标准溶液Bt1蛋白的ELISA检测结果

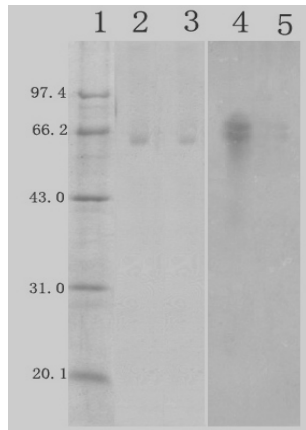
标准品浓度 μg/ml	10	5	2.5	1.25	0.625	0.312	0.156	0.078	0.039	0
OD ₄₉₂ 值	1.179	0.699	0.422	0.30	0.231	0.166	0.141	0.112	0.097	0.092
平均值	1.167	0.688	0.412	0.284	0.221	0.163	0.142	0.114	0.089	0.092
	1.191	0.707	0.432	0.313	0.165	0.169	0.143	0.104	0.099	0.092
平均值	1.179	0.698	0.422	0.299	0.232	0.166	0.142	0.110	0.095	0.092

表2 ELISA法/试剂盒法检测标准样品Bt1蛋白的结果

标样含量	0%		0.15%		0.5%		2%	
	ELISA法	试剂盒法	ELISA法	试剂盒法	ELISA法	试剂盒法	ELISA法	试剂盒法
OD ₄₉₂ 值	0.097	0.109	0.256	0.269	0.536	0.602	1.356	1.412
OD ₄₅₀ 值	0.101	0.114	0.226	0.248	0.533	0.593	1.378	1.422
平均值	0.099	0.109	0.245	0.258	0.523	0.597	1.369	1.405

表3 ELISA法/试剂盒法检测实物样品Bt1蛋白的结果

样品编号	ELISA法		试剂盒法		样品浓度 ($\mu\text{g/ml}$)	样品含量 (%)
	ELISA法	试剂盒法	ELISA法	试剂盒法		
玉米1号	1.394	1.492	1.245	1.494	10.786	0.849
玉米2号	0.156	0.109	0.163	0.096	0.276	0.016
玉米3号	0.697	0.772	0.676	0.748	5.040	0.845
玉米4号	0.308	0.317	0.327	0.317	1.750	0.259
空白对照	0.109	0.103	0.090	0.096	<0.100	<0.001



1-Mark; 2-标准蛋白电泳; 3-玉米1号电泳; 4-标准蛋白免疫印迹分析; 5-玉米1号免疫印迹分析

图3 Bt1蛋白的免疫印迹分析结果

2.3 建立的ELISA方法定量检测实物样品结果

将酶标仪测定的实物样品的ELISA法/试剂盒法结果列成表3,表中的样品浓度结果($\mu\text{g/ml}$)由浓度标准曲线(图1)换算得到,样品含量结果由百分比含量标准曲线(图2)换算得到。分析ELISA法的检测结果显示,玉米1号的蛋白浓度和百分比含量在四个检测样品中是最高的,玉米3、4号的检测值也都大于Bt1蛋白的ELISA最低可检值(表1)的 $0.312\ \mu\text{g/ml}$ 和表2的0.15%,因而可判定为检测结果阳性;玉米2号的检测值较低($0.276\ \mu\text{g/ml}$ 和0.016%),均小于Bt1蛋白的ELISA最低可检值,因而可判定为检测结果阴性。此外,在ELISA法检测实物样品的同时,设立了阴、阳性对照(见百分比含量标准曲线)和空白对照,对照实验结果显示本方法的检测结果是可靠的。

2.4 Bt1蛋白的免疫印迹分析结果

将Bt1玉米标准(2%)和玉米1号的蛋白溶液行SDS-PAGE电泳后,转移到PVDF膜上,用5%脱脂奶粉封闭非特异性位点,然后分别用一抗(兔抗Bt1抗体,1:200)及二抗(酶标羊抗兔,1:1000)进行反应,底物DAB- H_2O_2 显色。结果显示(图3)标准品和样品均在62kDa处出现显色条带,表明制备的Bt1抗体能特异性识别Bt1蛋白。

3 讨论

转基因产品的检测方法如分子杂交、PCR扩增和生物学测定等存在操作复杂、成本高及稳定性差的不足^[1],利用ELISA法检测玉米样品中Bt1蛋白具有快速、简单、低耗、结果客观易判定等优点,更为重要的是可对转基因产品的含量进行定量分析。利用Bt1晶体蛋白碱溶解液作为抗原,制备了相应的抗体,建立了检测玉米Bt1蛋白的ELISA定量检测方法,并测定出该法对Bt1蛋白的浓度最低可检值为 $0.312\ \mu\text{g/ml}$ (表1)和含量最低可检值为0.15%(表2)。

ELISA检测灵敏快速,但容易出现非特异性吸附及本底过高的问题^[3]。为此,采取了以下3个措施将本底减少到最低水平:(1)加入3%的牛血清蛋白以封闭板孔上非特异结合位点;(2)在洗涤液、抗体稀释液和底物缓冲液中加入适量的表面活性剂(Tween-20),并在样品包被、抗原-抗体反应和酶-底物反应之后反复洗涤以去除过量的物质;(3)采用正确的洗涤方法也很重要,洗涤液浸泡时间以3-5min的效果为好,倾倒板不易去除酶标板孔上粘附的气泡或水滴,要适当用力甩干。

在应用建立的ELISA方法定量分析实物样品时,在微孔板上同时设立了阳性、阴性标准样品和空白对照,并对每个样品作了3个平行检测,这样既便于制作每次实验的定量标准曲线,也有利于提高检测结果的可靠性与准确性。此外,经进口试剂盒和免疫印迹分析试验方法的进一步验证,结果表明建立的

ELISA法可以成功的检测转基因玉米中Bt1蛋白,并具有灵敏简便、快速准确、成本低的优点,为转基因玉米中Bt1蛋白的定性和定量检测提供了有效的手段,在进出境产品的检验检疫工作中有较高的实用价值。

参考文献

- 1 Anklam E, Gadani F, Heinze P, et al. Analytical methods for detection and determination of genetically modified organisms in agricultural crops and plant-derived food products. *Eur Food Res Technol*, 2002, 214: 3 ~ 26.
- 2 刘光明 苏文金. 转基因产品的检测方法. 集美大学学报(自然科学版), 2001 6(1): 87 ~ 92.
- 3 Dierker E, Eva MW, Shin YK, et al. Identification of unacceptable background caused by non-specific protein adsorption to the plates using a standardized ELISA. *Enzyme-Linked Methods*, 1999, 226: 85 ~ 91.
- 4 沈法富, 于元杰, 尹承侑等. 利用Dot-ELISA检测Bt棉杀虫蛋白的研究. *中国农业科学*, 1999 32(1): 15 ~ 19.
- 5 J. 萨姆布鲁克 E. F. 弗里奇 J. 曼尼阿蒂斯著. 金冬雁, 黎孟枫等译. 分子克隆实验指南(第二版). 北京: 科学出版社, 1995, 852 ~ 897.

HPLC 法检测低聚果糖的研究

张志国 生庆海 卢彦君 朱俊平 陆 淳

石家庄三鹿集团股份有限公司 石家庄 050071

摘 要 本文研究了高效液相色谱(HPLC)法检测低聚果糖的色谱条件和不同浓度低聚果糖对检出率的影响。结果表明,用高效液相色谱法检测低聚果糖的色谱条件为:流动相比(乙腈:水)=75:25(v/v),色谱柱温度为30℃、检测器灵敏度为+8。用此方法检测低聚果糖发现,低聚果糖的检出率随其浓度的不同呈现规律性变化。

关键词 低聚果糖 HPLC 检出率

Abstract In this paper, two factors that affected the detectable rate of FOS by HPLC were studied. One was chromatogram condition and the other was concentration. As a result, chromatogram conditions were as follows: the mobile phase proportion (ethanenitrile: water) was 75:25(v/v), the temperature of the chromatographic column was 30℃ and the detector's sensitivity was +8. By HPLC, the detectable rate of FOS changed regularly under different concentrations.

Key words FOS(fructo-oligosaccharide) HPLC Detectable rate

低聚果糖有双向调节人体肠道微生态的功能,即能增加肠道内双歧杆菌的数量,又能同时抑制其他有害菌的生长。而且低聚果糖很难被人体消化吸收,是一种低能量的糖,不会引起肥胖。同时,可以认为低聚果糖是一种水溶性膳食纤维,能降低血清胆固醇和甘油三酯含量,摄入后不会引起体内血糖值的大幅度升高。所以低聚果糖可以作为高血压、糖尿病和肥胖症等患者使用的低腐蚀性的防龋齿甜味剂。

低聚果糖已成为许多食品的重要有效成分之一,目前检测食品中低聚果糖含量的方法主要有纸色谱分离法、3,5-二硝基水杨酸法,气相色谱法和高效液相色谱法。液相色谱法的色谱条件有很多种,本研究用正交试验详细阐述了高效液相色谱法检测低聚果糖的色谱条件和不同浓度低聚果糖对检出率的影响。

1 试剂与仪器

1.1 试剂

乙腈(色谱纯);水:超纯水;低聚果糖浆(维尔康药业提供):分别配成糖浆浓度为0.3036g/100ml、0.607g/100ml、1.0122g/100ml、2.0265g/100ml、4.0060g/100ml、6.1186g/100ml溶液过0.45 μm滤膜备用。

葡萄糖、果糖、蔗糖标准溶液:称取葡萄糖、果糖、蔗糖各20mg于25ml容量瓶中,用蒸馏水溶解并定容稀释至刻度,过0.45 μm滤膜备用。

1.2 仪器及条件

美国Waters公司产高效液相色谱仪 Waters 410差示折光