



(12) 发明专利申请

(10) 申请公布号 CN 103808938 A

(43) 申请公布日 2014.05.21

(21) 申请号 201410098274.9

(22) 申请日 2014.03.16

(71) 申请人 吉林大学

地址 130012 吉林省长春市前进大街 2699 号

(72) 发明人 刘静波 陈晓飞 张燕

(74) 专利代理机构 长春市四环专利事务所(普通合伙) 22103

代理人 鞠传龙

(51) Int. Cl.

G01N 33/64 (2006.01)

G01N 33/531 (2006.01)

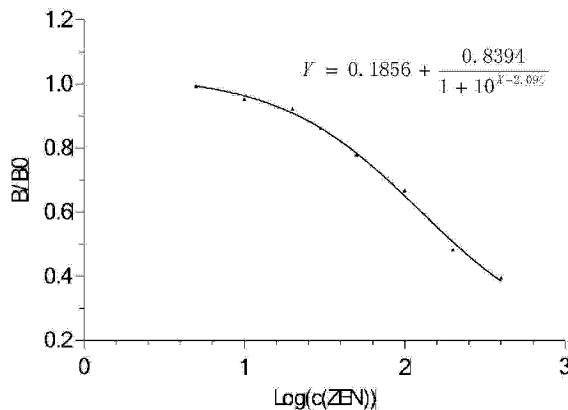
权利要求书1页 说明书5页 附图1页

(54) 发明名称

一种检测玉米赤霉烯酮的方法

(57) 摘要

本发明公开了一种检测玉米赤霉烯酮的方法,是采用 Mannich 法制备玉米赤霉烯酮的免疫抗原和检测抗原,免疫 Balb/c 小鼠,并获得相应的多抗血清,血清经过分离纯化后,间接 ELISA 检测其效价;然后将检测抗原包被于酶标板上,过夜、封闭,再加入标准毒素溶液、样品提取液,以及稀释后的多抗;反应后,加入羊抗鼠 IgG-HRP,再加入底物溶液显色,终止后,在 450nm 处检测 OD 值,绘制相关标准曲线,进而求出待测样品中 ZEN 的含量,有益效果:更有效的利用参加反应的毒素分子,从而节省成本;整个过程简便、易于操作、毒素分子的利用率也相对较高;该检测方法操作简便,无需专业人员培训,便于实地生产应用。



1. 一种检测玉米赤霉烯酮的方法,具体步骤如下所述:

第一步、制备阳离子化蛋白,主要制备阳离子化牛血清蛋白 cBSA 和阳离子化鸡卵清蛋白 cOVA;

第二步、采用 Mannich 法制备免疫抗原 ZEN-cBSA 和检测抗原 ZEN-cOVA;

第三步、取健康的 6-8 周雌性 Balb/c 小鼠 4 只,初次免疫用完全弗氏佐剂乳化后腹腔注射,每只鼠免疫剂量为 100 μ g ZEN-cBSA,注射体积为 0.2mL;之后加强免疫每两周腹腔注射一次,乳化用不完全弗氏佐剂;最后一次免疫使用生理盐水代替不完全弗氏佐剂,采用尾静脉注射,注射剂量和前面几次相同;一共免疫 6 次;从第 3 次免疫开始,每次免疫后 10 天断尾取血,间接 ELISA 检测小鼠血清效价;

第四步、小鼠在最后一次免疫后的第 10 天,摘眼球取血,处死小鼠;所获血液先置于室温下 2h,然后在 4 $^{\circ}$ C 条件下 3500rpm 离心 20min,离心之后的血清冻存于 -20 $^{\circ}$ C 的冰箱中;

第五步、纯化离心后的血清,间接 ELISA 确定血清效价;

第六步、检测抗原包被于酶标板上,在 4 $^{\circ}$ C 条件下过夜;

第七步、使用乙腈-水提取待检样品中的毒素,乙腈与水的体积比为 85:15;

第八步、洗涤酶标板,加入封闭液,反应 2h;

第九步、洗涤,冻存酶标板;或者加入标准毒素溶液、样品提取液,添加稀释后的血清上清;

第十步、洗涤,加入二抗羊抗鼠 IgG-HRP 反应;

第十一步、洗涤,加入底物液显色;

第十二步、终止,450nm 处酶标仪检测反应孔 OD 值。

2. 根据权利要求 1 所述的一种检测玉米赤霉烯酮的方法,其特征在于:所述的第二步中制备得到的免疫抗原中 ZEN 与 cBSA 的分子个数比的范围为 10:1-20:1。

3. 根据权利要求 1 所述的一种检测玉米赤霉烯酮的方法,其特征在于:所述的第三步中初次免疫和加强免疫乳化成功的标准是乳液在水中呈滴状,免疫的抗原剂量为 100 μ g/只。

4. 根据权利要求 1 所述的一种检测玉米赤霉烯酮的方法,其特征在于:所述的第五步中血清效价的判断标准为阳性孔的最大稀释倍数,而阳性孔的判断标准为 $(A_{\text{待检样品}} - A_{\text{空白}}) / (A_{\text{阴性}} - A_{\text{空白}}) \geq 2.1$,其中 A 为待检孔在 450nm 条件下的 OD 值。

5. 根据权利要求 1 所述的一种检测玉米赤霉烯酮的方法,其特征在于:所述的第六步中检测抗原 ZEN-cOVA 使用 100mmol/L pH=9.6 的 Na_2CO_3 - NaHCO_3 缓冲液稀释到 2 μ g/mL。

6. 根据权利要求 1 所述的一种检测玉米赤霉烯酮的方法,其特征在于:所述第九步中的血清上清按照效价 /2 的倍数稀释后加入。

一种检测玉米赤霉烯酮的方法

技术领域

[0001] 本发明属于一种检测真菌毒素的方法,特别涉及一种检测玉米赤霉烯酮的方法。

背景技术

[0002] 玉米赤霉烯酮(Zearalenone, ZEN)是由粉红镰刀菌和其他镰刀菌产生的一种激素类真菌毒素,常见于玉米、小麦、大米、大麦、小米和燕麦等谷物中,它可引起各种谷物的病变,有类似雌激素的毒作用,可刺激含雌激素受体的乳腺癌细胞增长,导致动物激素水平过高以及严重的生殖问题,还具有潜在的致癌性。目前用于检测玉米赤霉烯酮的方法主要有薄层色谱法、高效液相色谱法、酶联免疫法。薄层色谱法检测方便,但检测限高,不能很好的定量;高效液相色谱法检测准确、检测低,但需要复杂的样品前处理过程、专门的仪器以及专业的人员培训;前述的这些方法均存在着一些不足,不能有效快速地测出相应谷物中所含有的玉米赤霉烯酮。

发明内容

[0003] 本发明的目的是针对现有的检测玉米赤霉烯酮的方法中存在的一些问题而提供的一种检测玉米赤霉烯酮的方法。

[0004] 本发明所述的检测玉米赤霉烯酮的方法是采用 Mannich 法制备玉米赤霉烯酮的免疫抗原和检测抗原,免疫 Ba1b/c 小鼠,并获得相应的多抗血清,血清经过分离纯化后,间接 ELISA 检测其效价;然后将检测抗原包被于酶标板上,过夜、封闭,再加入标准毒素溶液、样品提取液,以及稀释后的多抗;反应后,加入羊抗鼠 IgG-HRP,再加入底物溶液显色,终止后,在 450nm 处检测 OD 值,绘制相关标准曲线,进而求出待测样品中 ZEN 的含量,具体步骤如下所述:

[0005] 第一步、制备阳离子化蛋白,主要制备阳离子化牛血清蛋白 cBSA 和阳离子化鸡卵清蛋白 cOVA;

[0006] 第二步、采用 Mannich 法制备免疫抗原 ZEN-cBSA 和检测抗原 ZEN-cOVA;

[0007] 第三步、取健康的 6-8 周雌性 Ba1b/c 小鼠 4 只,初次免疫用完全弗氏佐剂乳化后腹腔注射,每只鼠免疫剂量为 100 μ g ZEN-cBSA,注射体积为 0.2mL;之后加强免疫每两周腹腔注射一次,乳化用不完全弗氏佐剂;最后一次免疫使用生理盐水代替不完全弗氏佐剂,采用尾静脉注射,注射剂量和前面几次相同;一共免疫 6 次;从第 3 次免疫开始,每次免疫后 10 天断尾取血,间接 ELISA 检测小鼠血清效价;

[0008] 第四步、小鼠在最后一次免疫后的第 10 天,摘眼球取血,处死小鼠;所获血液先置于室温下 2h,然后在 4 $^{\circ}$ C 条件下 3500rpm 离心 20min,离心之后的血清冻存于 -20 $^{\circ}$ C 的冰箱中;

[0009] 第五步、纯化离心后的血清,间接 ELISA 确定血清效价;

[0010] 第六步、检测抗原包被于酶标板上,在 4 $^{\circ}$ C 条件下过夜;

[0011] 第七步、使用乙腈-水提取待检样品中的毒素,乙腈与水的体积比为 85:15;

- [0012] 第八步、洗涤酶标板,加入封闭液,反应 2h ;
- [0013] 第九步、洗涤,冻存酶标板 ;或者加入标准毒素溶液、样品提取液,添加稀释后的血清上清 ;
- [0014] 第十步、洗涤,加入二抗羊抗鼠 IgG-HRP 反应 ;
- [0015] 第十一步、洗涤,加入底物液显色 ;
- [0016] 第十二步、终止,450nm 处酶标仪检测反应孔 OD 值。
- [0017] 第二步中制备得到的免疫抗原中 ZEN 与 cBSA 的分子个数比的范围为 10:1-20:1。
- [0018] 第三步中初次免疫和加强免疫乳化成功的标准是乳液在水中呈滴状,不会迅速扩散,免疫的抗原剂量为 100 μ g/ 只。
- [0019] 第五步中血清效价的判断标准为阳性孔的最大稀释倍数,而阳性孔的判断标准为 $(A_{\text{待检样品}} - A_{\text{空白}}) / (A_{\text{阴性}} - A_{\text{空白}}) \geq 2.1$,其中 A 为待检孔在 450nm 条件下的 OD 值。
- [0020] 第六步中检测抗原 ZEN-cOVA 使用 100mmol/L pH=9.6 的 Na_2CO_3 - NaHCO_3 缓冲液稀释到 2 μ g/mL。
- [0021] 第九步中封闭过的酶标板能够直接用于检测玉米赤霉烯酮,血清上清按照效价 /2 的倍数稀释后加入,也可以冻存于 -20 $^{\circ}$ C 下,便于以后随时进行检测。
- [0022] 本发明的有益效果 :
- [0023] 1、毒素免疫和检测偶联的蛋白选用阳离子化的蛋白,即阳离子化牛血清蛋白(cBSA)和阳离子化鸡卵清蛋白(cOVA),阳离子化蛋白较正常蛋白可以结合更多的毒素分子,同时更有效的利用参加反应的毒素分子,从而节省成本 ;
- [0024] 2、偶联方法选择 Mannich 法,而非传统的活性酯法和酸酐法。传统的方法往往需要先对毒素分子进行脲化,而脲化往往伴随较为复杂的有机反应。脲化过程不仅需要引入各种有毒有害试剂、过程繁琐,而且毒素有可能在这个过程中损失,影响后期偶联的效率。Mannich 法则省去了较为繁琐的脲化过程,整个过程简便、易于操作、毒素分子的利用率也相对较高 ;
- [0025] 3、此法较传统的高效液相法,更易于操作,且特异性强 ;较薄层色谱法,检测限低,易于定量 ;检测抗原包被在酶标板上后,可冻存起来,便于后期样品的检测 ;且该检测方法操作简便,无需专业人员培训,便于实地生产应用。

附图说明

- [0026] 图 1 为多抗血清间接竞争 ELISA 曲线图,其中横坐标为 ZEN 浓度的对数,ZEN 浓度单位为 ng/mL ;纵坐标为检测孔 OD 值 B 与空白孔 OD 值 B0 的比值。

具体实施方式

- [0027] 本发明所述的检测玉米赤霉烯酮的方法是采用 Mannich 法制备玉米赤霉烯酮的免疫抗原和检测抗原,免疫 Balb/c 小鼠,并获得相应的多抗血清,血清经过分离纯化后,间接 ELISA 检测其效价 ;然后将检测抗原包被于酶标板上,过夜、封闭,再加入标准毒素溶液、样品提取液,以及稀释后的多抗 ;反应后,加入羊抗鼠 IgG-HRP,再加入底物溶液显色,终止后,在 450nm 处检测 OD 值,绘制相关标准曲线,进而求出待测样品中 ZEN 的含量,具体步骤如下所述 :

[0028] 第一步、制备阳离子化蛋白,主要制备阳离子化牛血清蛋白 cBSA 和阳离子化鸡卵清蛋白 cOVA ;

[0029] 第二步、采用 Mannich 法制备免疫抗原 ZEN-cBSA 和检测抗原 ZEN-cOVA ;

[0030] 第三步、取健康的 6-8 周雌性 Balb/c 小鼠 4 只,初次免疫用完全弗氏佐剂乳化后腹腔注射,每只鼠免疫剂量为 100 μ g ZEN-cBSA,注射体积为 0.2mL ;之后加强免疫每两周腹腔注射一次,乳化用不完全弗氏佐剂 ;最后一次免疫使用生理盐水代替不完全弗氏佐剂,采用尾静脉注射,注射剂量和前面几次相同 ;一共免疫 6 次 ;从第 3 次免疫开始,每次免疫后 10 天断尾取血,间接 ELISA 检测小鼠血清效价 ;

[0031] 第四步、小鼠在最后一次免疫后的第 10 天,摘眼球取血,处死小鼠 ;所获血液先置于室温下 2h,然后在 4 $^{\circ}$ C 条件下 3500rpm 离心 20min,离心之后的血清冻存于 -20 $^{\circ}$ C 的冰箱中 ;

[0032] 第五步、纯化离心后的血清,间接 ELISA 确定血清效价 ;

[0033] 第六步、检测抗原包被于酶标板上,在 4 $^{\circ}$ C 条件下过夜 ;

[0034] 第七步、使用乙腈 - 水提取待检样品中的毒素,乙腈与水的体积比为 85:15 ;

[0035] 第八步、洗涤酶标板,加入封闭液,反应 2h ;

[0036] 第九步、洗涤,冻存酶标板 ;或者加入标准毒素溶液、样品提取液,添加稀释后的血清上清 ;

[0037] 第十步、洗涤,加入二抗羊抗鼠 IgG-HRP 反应 ;

[0038] 第十一步、洗涤,加入底物液显色 ;

[0039] 第十二步、终止,450nm 处酶标仪检测反应孔 OD 值。

[0040] 第二步中制备得到的免疫抗原中 ZEN 与 cBSA 的分子个数比的范围为 10:1-20:1。

[0041] 第三步中初次免疫和加强免疫乳化成功的标准是乳液在水中呈滴状,不会迅速扩散,免疫的抗原剂量为 100 μ g/ 只。

[0042] 第五步中血清效价的判断标准为阳性孔的最大稀释倍数,而阳性孔的判断标准为 $(A_{\text{待检样品}} - A_{\text{空白}}) / (A_{\text{阴性}} - A_{\text{空白}}) \geq 2.1$,其中 A 为待检孔在 450nm 条件下的 OD 值。

[0043] 第六步中检测抗原 ZEN-cOVA 使用 100mmol/L pH=9.6 的 Na_2CO_3 - NaHCO_3 缓冲液稀释到 2 μ g/mL。

[0044] 第九步中封闭过的酶标板能够直接用于检测玉米赤霉烯酮,血清上清按照效价 /2 的倍数稀释后加入,也可以冻存于 -20 $^{\circ}$ C 下,便于以后随时进行检测。

[0045] 具体实施过程如下所述 :

[0046] 一、制备多抗血清 :

[0047] 1、制备阳离子化蛋白 :

[0048] 取 670 μ L 100mmol/L 的乙磺酸 (MES) 溶液 (pH=4.8) 置于冰浴中,加入相同体积的乙二胺 (EDA),然后用 0.4mol/L 的稀盐酸溶液调节混合液的 pH 值为 4.8,标记为 A 液 ;取 500 μ L MES 缓冲液,向其中加入 50mg 牛血清蛋白 (BSA) 和 30mg 1-(3-二甲氨基丙基)-3-乙基碳二亚胺盐酸盐 (EDC),标记为 B 液 ;将 B 液加入到 A 液,室温下磁力搅拌反应 2h ;加入 400 μ L 2mol/L 的醋酸溶液终止反应。蒸馏水中透析 72h,得到的脱盐的阳离子化牛血清蛋白 (cBSA) 冷冻干燥后,保存于 -20 $^{\circ}$ C,同样的方法制备阳离子化鸡卵清蛋白 (cOVA) ;

[0049] 2、制备免疫抗原和检测抗原 :

[0050] 免疫抗原的制备:称量 600 μ g 的 cBSA 作为偶联物溶解于 500 μ L MES 溶液中,称量 100 μ g ZEN 溶于 50 μ L 二甲基甲酰胺(DMF)中;将 ZEN 溶液缓慢加入到 cBSA 溶液中,轻轻搅拌混合液,然后向混合液中加入 50 μ L 的甲醛,立即移入 37 $^{\circ}$ C 培养箱中,轻轻搅拌反应 24h。用离心过滤纯化装置纯化 ZEN-cBSA 结合物,重复 2 次,冻干后,保存于 -20 $^{\circ}$ C 的冰箱中;

[0051] 同样的方法选择 cOVA 作为偶联物制备检测抗原;

[0052] 3、免疫小鼠:取健康的 6-8 周雌性 Balb/c 小鼠 4 只,初次免疫用完全弗氏佐剂乳化后腹腔注射,每只鼠免疫剂量为 100 μ g ZEN-cBSA,注射体积为 0.2mL;之后加强免疫每两周腹腔注射一次,乳化用不完全弗氏佐剂;最后一次免疫使用生理盐水代替不完全弗氏佐剂,采用尾静脉注射,注射剂量和前面几次相同;一共免疫六次;从第三次免疫开始,每次免疫后十天断尾取血,间接 ELISA 检测小鼠血清效价;

[0053] 4、最后一次免疫后,第 10 天,摘眼球取血,处死小鼠;血液室温下静止 2h 后,3500rpm 离心 20min,血清冻存于 -20 $^{\circ}$ C 的环境下;

[0054] 5、采用正辛酸法纯化血清:抗血清用 4 倍体积的 60mmol/L 的乙酸-乙酸钠缓冲液稀释,用 100mmol/L NaOH 调至 pH4.5;边搅拌边缓慢滴加辛酸(25mL/L 血清稀释液),加完后,搅拌 30min;10000rpm 离心 30min,收集上清;纱布过滤后,按 1/10 体积加入 10 \times PBS,5mol/L NaOH 调至 pH7.4;上清液 4 $^{\circ}$ C 预冷,计算总体积,按 277g/L 加入硫酸铵粉末,边加边搅拌,加完后继续搅拌 30min;5000rpm 离心 15min,弃去上清,收集沉淀;沉淀用少量透析液溶解,透析并更换两次透析液;收集上清液,-20 $^{\circ}$ C 的条件下冻存;

[0055] 6、间接 ELISA 检测上清液效价:阳性孔的判断标准为 $(A_{\text{待检样品}} - A_{\text{空白}}) / (A_{\text{阴性}} - A_{\text{空白}}) \geq 2.1$,阳性孔的最大稀释倍数即为抗体效价,其中 A 为待检孔在 450nm 条件下的 OD 值。

[0056] 二、标准试样制备:

[0057] 1、洗涤液:在 100mmol/L pH 值为 7.4 的磷酸盐缓冲液中加入 0.05% 的吐温 -20;

[0058] 2、封闭液:在 100mmol/L pH 值为 7.4 的磷酸盐缓冲液加入 1% 牛血清白蛋白;

[0059] 3、样品稀释液:在 100mmol/L pH 值为 7.4 的磷酸盐缓冲液中加入 10% 甲醇;

[0060] 4、检测抗原稀释液:在 pH 值为 7.4 的磷酸盐缓冲液中加入 0.05% 的牛血清白蛋白 BSA;

[0061] 5、终止液:1mol/L 盐酸溶液;

[0062] 6、提取液:乙腈:水=85:15(体积比);

[0063] 7、底物液:选择 Invitrogen 公司的 TMB Single Solution;

[0064] 8、制备玉米赤霉烯酮抗体包被反应板:用 100mmol/L pH9.6 的碳酸盐缓冲液将 ZEN-cOVA 稀释为 2 μ g/mL,加到 96 孔酶标板中,每孔 100 μ L,4 $^{\circ}$ C 冰箱放置过夜,弃去包被液,满孔洗涤 3 次,每孔加 200 μ L 封闭液封闭,置于 37 $^{\circ}$ C 2h,弃其封闭液将包被板包装后置 -20 $^{\circ}$ C 冷冻保存;

[0065] 9、制备玉米赤霉烯酮标准溶液:将样品稀释液为溶剂配制 5-400ng/ml (5、10、20、30、50、100、200、400) 的赤霉烯酮标准系列溶液。

[0066] 三、检测样品:

[0067] 1、待测样品前处理:称取 10g 粉碎且过 20 目筛的样品置于磨口的 100ml 锥形瓶中,加入乙腈-水(体积比 85:15) 40ml,加塞振荡 30min,过滤即为待测样液;

- [0068] 2、反应孔标记：1-6号孔为玉米赤霉烯酮(ZEA)标准对照孔，7号孔为空白对照孔，另根据需要设定待测样品孔的数量；所有反应孔设定平行样；
- [0069] 3、根据标记依次加入配置好的标准溶液及待测样液，在1-6号试管中加入玉米赤霉烯酮标准溶液 50 μ L，在7号试管中加入 50 μ L 样品稀释液，在其余孔中分别加入待测样液 50 μ L；
- [0070] 4、在各孔中分别加入 50 μ L 按照（效价/2）倍比稀释的多抗上清，轻轻地振荡，使各孔中的反应物混匀；
- [0071] 5、将酶标板置于 37 $^{\circ}$ C 恒温箱中孵育 1h；
- [0072] 6、取出酶标板，甩掉反应液，拍干，洗涤液满孔洗涤，振荡 3min 后，甩净，拍干，重复洗板 3 次；
- [0073] 7、酶标板反应孔每孔加入 1:5000 倍比稀释的羊抗鼠 IgG-HRP，置于 37 $^{\circ}$ C 恒温箱中孵育 1h；
- [0074] 8、取出酶标板，甩掉反应液，拍干，洗涤液满孔洗涤，振荡 3min 后，甩净，拍干，重复洗板 5 次；
- [0075] 9、酶标板每孔加入 TMB 溶液 100 μ L，置于暗处室温反应 20min；
- [0076] 10、取出酶标板，每孔加入终止液 100 μ L，在 450nm 处测定各孔的 OD 值；
- [0077] 11、利用 GraphPad Prism5 软件以标准溶液孔的 OD 值 B 与空白孔的 OD 值 B₀ 的比值 (B/B₀) 为函数值，以标准溶液的浓度对数的为自变量，制作曲线，求回归方程，见附图 1；根据方程可求出样品孔对应毒素的浓度；
- [0078] 12、根据 GraphPad Prism5 软件自带的剂量 - 效应(抑制模型)对数据进行非线性回归拟合，可得公式(1)，其中 Y 为待测样品 OD 值和空白孔 OD 值的比值，X 为所测样品中 ZEN 的浓度，单位为 ng/mL；根据待测样品前处理过程可得公式(2)，其中 X 为所测样品中 ZEN 的浓度，单位为 ng/mL，x 为所测样品中 ZEN 的含量，单位为 ng/g，V 为提取液的总体积，单位为 mL，m 为待测样品的质量，单位为 g；

$$[0079] \quad Y = 0.1856 + \frac{0.8394}{1 + 10^{X-2.094}} \quad (1)$$

$$[0080] \quad x = 20VX/m \quad (2)$$

[0081] 结合(1)、(2)式，可得：

$$[0082] \quad x = 10^{3.90-3X} * 20V/m$$

[0083] 即：

$$[0084] \quad y = 10^{3.90-3x} * 20V/m \quad (3)$$

[0085] 其中，x 为待测样品 OD 值和空白孔 OD 值的比值，V 为提取液的体积，单位为 mL，m 为待测样品的质量，单位为 g，y 为待测样品中 ZEN 的含量，单位为 ng/g。

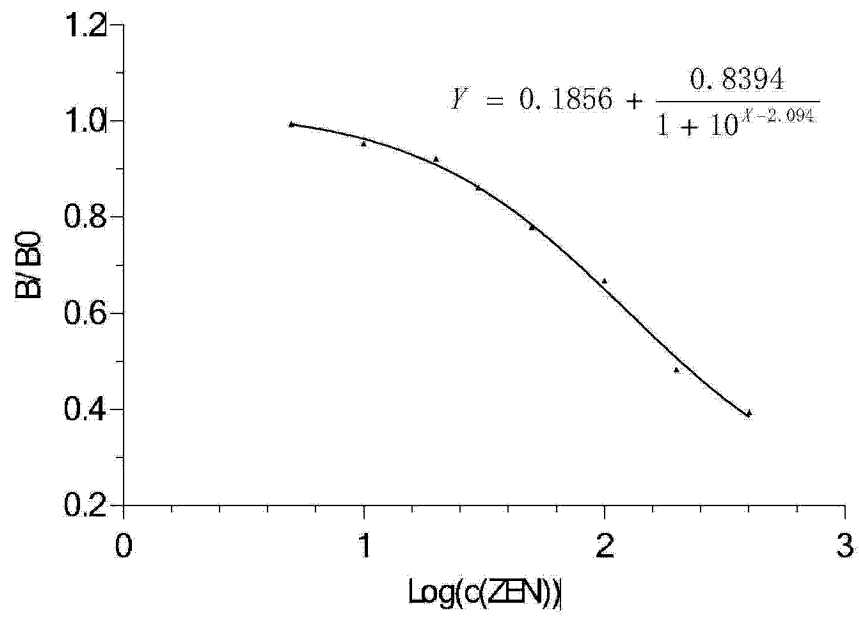


图 1

专利名称(译)	一种检测玉米赤霉烯酮的方法		
公开(公告)号	CN103808938A	公开(公告)日	2014-05-21
申请号	CN201410098274.9	申请日	2014-03-16
[标]申请(专利权)人(译)	吉林大学		
申请(专利权)人(译)	吉林大学		
当前申请(专利权)人(译)	吉林大学		
[标]发明人	刘静波 陈晓飞 张燕		
发明人	刘静波 陈晓飞 张燕		
IPC分类号	G01N33/64 G01N33/531		
CPC分类号	G01N33/543 G01N33/64		
代理人(译)	鞠传龙		
外部链接	Espacenet SIPO		

摘要(译)

本发明公开了一种检测玉米赤霉烯酮的方法，是采用Mannich法制备玉米赤霉烯酮的免疫抗原和检测抗原，免疫Balb/c小鼠，并获得相应的多抗血清，血清经过分离纯化后，间接ELISA检测其效价；然后将检测抗原包被于酶标板上，过夜、封闭，再加入标准毒素溶液、样品提取液，以及稀释后的多抗；反应后，加入羊抗鼠IgG-HRP，再加入底物溶液显色，终止后，在450nm处检测OD值，绘制相关标准曲线，进而求出待测样品中ZEN的含量，有益效果：更有效的利用参加反应的毒素分子，从而节省成本；整个过程简便、易于操作、毒素分子的利用率也相对较高；该检测方法操作简便，无需专业人员培训，便于实地生产应用。

