

# 胶体金免疫层析法参数的优化

许定花, 刘丽强, 郑蓓蓓, 陈 伟, 彭池方, 王利兵, 胥传来\*

(江南大学食品学院, 江苏 无锡 214122)

**摘 要:** 研究胶体金免疫层析法中几种重要影响因素的参数优化, 并以甲基对氧磷为对象进行实验。首先对现有的抗体纯化方法进行优化选择, 根据 SDS- 聚丙烯酰胺凝胶电泳结果确定最佳抗体纯化方法, 并用该法对目标抗体甲基对氧磷进行纯化。将纯化后的多克隆抗体与 30nm 的胶体金溶液进行标记, 并对金标记抗体进行纯化。对反应溶液系统进行筛选, 确定最合适的重悬液、抗原稀释液以及样品垫处理液。最终对试纸条的灵敏度, 样品基质对试纸条的影响进行评测, 对于目标检测物的裸眼检测限达到 5  $\mu\text{g/ml}$ , 样品的基质效应对试纸条的性能没有影响。  
**关键词:** 甲基对氧磷; 胶体金; 农药残留检测; 试纸条; 快速检测

## Optimization of Parameters of Colloidal Golden Immune Chromatography

XU Ding-hua, LIU Li-qiang, ZHENG Bei-bei, CHEN Wei, PENG Chi-fang, WANG Li-bing, XU Chuan-lai\*  
(School of Food Science and Technology, Jiangnan University, Wuxi 214122, China)

**Abstract:** Methyl paraoxon was subjected to explore the optimal parameters of colloidal gold immune chromatography. First, currently available antibody purification methods were screened to decide the optimal one based on SDS-PAGE. The obtained optimal method was used to purify methyl paraoxon antibodies. Then, the labeling was completed through the reaction between purified polyclonal antibodies and colloidal gold solutions with 30 nm of particle size. Reaction solutions were further screened to determine the optimal re-suspension, dilution of antigens and treatment solutions for sample pads. Finally, the dipsticks with colloidal gold were developed, which exhibited simple and rapid detection of methyl paraoxon. The final performance on these test strips was evaluated and the detection limit for targets was 5  $\mu\text{g/ml}$  using naked eye.

**Key words:** methyl paraoxon; colloidal gold; pesticide residue detection; dipstick; rapid detection

中图分类号: TS207.5

文献标识码: A

文章编号: 1002-6630(2009)20-0155-05

甲基对硫磷俗称甲基 1605, 学名 *O,O*-二甲基-*O*-(4-硝基苯基)硫代磷酸酯, 一种有机磷杀虫剂。工业产品为带蒜臭的黄棕色油状液体, 纯品为白色结晶, 熔点 36~36.5℃, 沸点 154℃(0.133kPa), 相对密度 1.358(4~20℃), 折光率 1.5367(25℃), 难溶于水, 易溶于有机溶剂, 加热会异构化, 高温或遇碱易分解。急性毒性  $\text{LD}_{50}$  值: 对大白鼠经口为 14~24mg/kg, 对兔经皮为 300~400mg/kg, 属高毒级农药<sup>[1-5]</sup>。甲基对硫磷杀虫谱广, 属高毒杀虫剂, 在光照条件下, 容易进行光氧化反应而生成比其本身毒性更大的甲基对氧磷。

随着高新分析技术引入农药残留检测之中, 发达国家目前经常采用如气相色谱与质谱联用技术、液相色谱与质谱联用技术、毛细管电泳与质谱联用、以及气相、液相色谱与多级质谱联用技术等。这些技术的应用大大提高了农药残留检测的定性能力和检测的灵敏度、检测

限和检测覆盖范围<sup>[6-11]</sup>。

目前对农药残留的检测方法有很多, 使用胶体金免疫层析法检测甲基对氧磷更为快速、廉价、简便。市场上已有的产品最低检测限为 10  $\mu\text{g/ml}$ , 本研究通过优化试纸条的主要参数条件, 增强其灵敏度和适用性, 为甲基对氧磷更快速、准确的检出提供研究基础。

## 1 材料与方法

### 1.1 材料与试剂

硝酸纤维素膜(NC膜) 美国 Millipore 公司; 金标垫、样品垫、吸水纸、PVC 底板 上海捷宇生物科技有限公司。

甲基对氧磷抗体、甲基对氧磷包被原、胶体金溶液 实验室制备; PVP Fluka 公司; 牛血清蛋白 上海伯奥生物科技有限公司; PEG20000、蔗糖 中国医药集团上

收稿日期: 2009-07-09

作者简介: 许定花(1985—), 女, 硕士研究生, 研究方向为残留物检测。E-mail: xiaoxishui0102@gmail.com

\* 通讯作者: 胥传来(1965—), 男, 教授, 博士, 研究方向为食品安全。E-mail: xcl@jiangnan.edu.cn

海化学试剂总公司; 羊抗兔 IgG、Brij-35、Titionx100 康成生物工程公司; Tween-20 浙江龙游县化工试剂厂。

## 1.2 仪器与设备

恒温磁力搅拌器 上海沪西分析仪器厂; 双重纯水蒸馏器 金坛市荣华仪器制造有限公司; 高速冷冻离心机 上海安亭科学仪器厂; 电子分析天平 上海 Mettler Toledo 公司; 紫外可见光谱仪 日本岛津公司; 微量移液器 Thermo Labsystems 公司; 数码相机 Nikon Coolpix5400 日本 Nikon 公司; 电热鼓风干燥箱 上海精宏实验设备有限公司。

## 1.3 方法

### 1.3.1 溶液的配制

PBS(0.01mol/L, pH7.4 的磷酸盐缓冲液); 重悬液: 0.01mol/L pH7.4 PBS(10% 蔗糖, 0.1% BSA, 0.1% Tween-20); 抗原稀释液: 0.01mol/L pH7.4 PBS; 样品垫处理液: 0.01mol/L pH7.4 PBS(含 0.4% Brij-35); 人工尿样见表 1~4。

表 1 人工尿样配方一  
Table 1 Formula 1 of artificial urine

配方一	NaCl	KCl	CaSO <sub>4</sub>	MgSO <sub>4</sub>	NaH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub>	CO(NH <sub>2</sub> ) <sub>2</sub>	Na <sub>2</sub> SO <sub>4</sub>	C <sub>6</sub> H <sub>12</sub> N <sub>2</sub> O
质量(g)	0.32	0.5	0.045	0.0385	0.031	1.86	0.42	0.11

注: 定容至 100ml。

表 2 人工尿样配方二  
Table 2 Formula 2 of artificial urine

配方二	NaCl	KCl	NaH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub>	CO(NH <sub>2</sub> ) <sub>2</sub>	OVA(卵清蛋白)	C <sub>6</sub> H <sub>12</sub> N <sub>2</sub> O
质量(g)	1.0	0.6	0.64	2.43	0.005	0.2

注: 定容至 100ml。

表 3 人工尿样配方三  
Table 3 Formula 3 of artificial urine

配方三	NaCl	KCl	CaCl <sub>2</sub>	MgSO <sub>4</sub>	CO(NH <sub>2</sub> ) <sub>2</sub>	25% 氨水
质量(g)	1.41	0.28	0.06	0.043	1.73	0.19ml

注: 0.02mol/L 盐酸定容至 100ml。

表 4 人工尿样配方四  
Table 4 Formula 4 of artificial urine

配方四	质量(g)	配方四	质量(g)
NaCl	0.52	C <sub>6</sub> H <sub>5</sub> O <sub>7</sub>	0.042
CaCl <sub>2</sub>	0.028	CH <sub>3</sub> CHOHCOOH	0.009
MgSO <sub>4</sub>	0.24	CO(NH <sub>2</sub> ) <sub>2</sub>	1.021
KH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub>	0.142	NH <sub>4</sub> Cl	0.134
K <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub>	0.16	NaHCO <sub>3</sub>	0.21

注: 定容至 100ml。

### 1.3.2 胶体金的制备

玻璃器皿的准备: 制备胶体金的所有玻璃器皿先用自来水流水冲洗干净, 再用酸液浸泡 72h(重铬酸钾 1000g, 加入浓硫酸 2500ml, 加蒸馏水至 10000ml), 取

出后用大量自来水冲洗, 洗洁精洗涤, 蒸馏水浸泡 24h 后用去离子水冲洗 3 次, 37℃ 烘箱烘干后备用。

试剂的配制要求: 所有胶体金配制试剂用双蒸馏水或三蒸馏水, 随后再用 0.22 μm 微孔滤膜过滤后使用。

柠檬酸三钠还原法制备胶体金: 由于氯化金极易吸湿, 因此使用小剂量封装的氯化金时, 必须一次配完。将 1g 的氯化金一次溶解于双蒸水中配成 1% 的水溶液。放在 4℃ 冰箱内保存, 保存时间长达几个月至 1 年左右。再取 1% 的氯金酸溶液 10ml, 配制成浓度为 0.1g/L 的氯金酸溶液。

取 0.1g/L 氯金酸溶液 200ml 放入锥形瓶, 用恒温电搅拌器加热至沸腾并持续 2min, 在 100r/min 磁力搅拌下, 加入 1% 柠檬酸三钠水溶液 3ml, 保持温度和搅拌速度不变, 继续搅拌加热 6min, 直至溶液呈透亮的酒红色。室温冷却, 4℃ 保存备用<sup>[12]</sup>。

胶体金的质量鉴定: 采用紫外扫描鉴定: 将胶体金溶液进行波长 300~650nm 紫外扫描, 确定金粒子大小。

### 1.3.3 胶体金标记抗体蛋白

抗体蛋白前处理: 用辛酸-硫酸铵法纯化抗体, 紫外分光光度计测  $A_{280nm}$  和  $A_{260nm}$ , 计算蛋白含量, 公式为:

$$\text{IgG 含量} = 1.45 \times A_{280nm} - 0.74 \times A_{260nm}$$

标记蛋白最佳 pH 值的确定: 在 1ml 胶体金溶液中, 用 0.1mol/L K<sub>2</sub>CO<sub>3</sub> 或 0.1mol/L HCl 调节 4 管胶体金溶液的 pH 值至 6.0、7.0、8.0、9.0, 然后在每管胶体金溶液中各加入 10 μg 抗体蛋白, 混匀, 静置 20min, 再分别加入 100 μl 10% 的 NaCl, 使游离胶体金聚合, 再静置 2h 后, 出现蓝色沉淀的则 pH 值不适合。

胶体金标记最佳抗体蛋白浓度的确定: 确定最佳抗体蛋白浓度一般有两种方法: 分光光度计测定法和目测法。本实验采用目测法确定最佳标记浓度。

0.1mol/L K<sub>2</sub>CO<sub>3</sub> 或 0.1mol/L HCl 调节胶体金溶液 pH 值至最佳。将 pH7.0 的胶体金溶液分装 3 管, 每管 1ml, 分别逐滴加入所需抗体 10、8、5 μg/ml, 静置 20min, 逐滴加入 20% BSA, 使 BSA 的终浓度为 1%, 静置 20min, 6500r/min 离心 15min 后弃上清, 用重悬液重悬, 混匀待用。

### 1.3.4 试纸条膜的选择

选用的硝酸纤维素膜(NC)膜为 Prima-40, 金标垫为 Ahlstrom-8964, 样品垫为 GF-06。

### 1.3.5 试纸条的组装

用喷膜机把选定浓度的包被抗原及羊抗兔 IgG 喷在 NC 膜上, 分别作为检测线(T)和控制线(C), 在 37℃ 烘箱干燥 10min。以同样方法, 将一定浓度的金标抗体包被在结合垫上。

试纸条组成为一个 PVC 背板, 在其上按顺序粘上样

品垫、胶体金结合垫、硝酸纤维素膜和吸水垫(图1)。用带 MARK 胶带绕背板覆盖在样品垫、胶体金结合垫及吸水垫上。用切割机将贴好的板切割成 3mm 宽的条,然后将试纸条与干燥剂一起装入铝箔袋内密封保存。

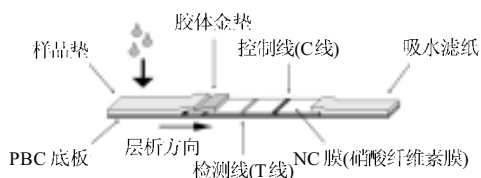


图1 免疫层析试纸条结构图

Fig.1 Structure of strips for immune chromatography

### 1.3.6 试纸条的测试方法

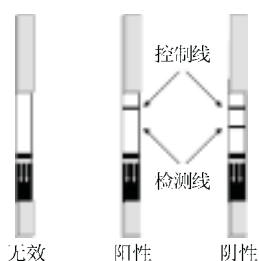


图2 竞争法胶体金试纸条显色示意图

Fig.2 Schematic diagram of immune golden strips by a competitive method

当试纸条以样品垫末端浸入样本后,样品溶液沿着试纸条通过毛细作用从下往上泳动,溶解金标垫上干燥的金标抗体,若待测样品中不存在待测药物,则金标抗体会直接泳动到检测线和硝酸纤维素膜上的包被原发生免疫反应,从而胶体金颗粒发生聚集,形成红色的线条,然后其他未结合的金标抗体继续通过毛细管作用向前泳动,与控制线上的羊抗兔二抗发生第二次免疫反应,同样形成红色线条,这样NC膜上就会有两条红色线条,表示样品为阴性。若待测样品中存在待测药品,则金标抗体首先会和样品中的检测物发生免疫反应,当未发生反应的金标抗体有剩余时,才会在检测线上与包被原发生免疫反应,形成红色线条,其颜色强度弱于阴性时的线条强度;而当金标抗体全部和样品中的抗体发生免疫结合时,就不会再有抗体与控制线包被原结合,从而检测线就不会有红色线条出现。控制线是为检验金标免疫层析方法本身是否有效而设定的,所以无论样品中是否存在待测药物,控制线都应该显现。如果控制线不显色,则说明试纸条失效<sup>[13]</sup>。

### 1.3.7 溶液系统的优化

重悬液的选择:在金标抗体的纯化过程中,用重悬液对离心后的暗红色沉淀进行混悬,最后观察金标抗

体溶液的释放的均一性及试纸条的显色情况。

样品垫处理液的选择:用处理液对样品垫进行处理,37℃烘干后待用,与样品垫不处理对照并观察试纸条的显色情况。

### 1.3.8 T线浓度的优化

取1ml胶体金溶液于离心管中,调节pH值为7.0左右,标记量5μg/ml,用重悬液5倍浓缩重悬(即用1/5的重悬液体积重悬上述胶体金溶液)在NC膜上划线,0.5mg/ml二抗划C线,分别用0.3、0.5、0.6mg/ml 3个浓度的甲基对氧磷包被原划T线,测试结果,选择显色清晰且包被原浓度较低的浓度作为最佳T线浓度。

### 1.3.9 C线浓度的优化

取1ml胶体金溶液于离心管中,调节pH值为7.0左右,标记5μg/ml,用重悬液5倍浓缩重悬,在NC膜上划线,分别用1.0、0.5、0.3mg/ml 3个浓度的二抗划C线,0.3mg/ml甲基对氧磷包被原划T线,测试结果选择显色清晰且包被原浓度较低的浓度作为最佳C线浓度。

### 1.3.10 样品基质影响测试

pH值的影响:取1ml胶体金溶液于离心管中,调节pH值为7.0左右,标记5μg/ml,用重悬液5倍浓缩重悬,0.5mg/ml二抗划C线,0.3mg/ml甲基对氧磷包被原划T线,调节加入样品的pH值分别为5.0、6.0、7.0、8.0、9.0、10.0,测试显色情况,观察样品pH值对显色的影响。

有机溶剂的影响:取1ml胶体金溶液于离心管中,调节pH值为7.0左右,标记5μg/ml,用重悬液5倍浓缩重悬,0.5mg/ml二抗划C线,0.3mg/ml甲基对氧磷包被原划T线,在样品中加入甲醇使样品中甲醇含量分别为5%、10%、20%、30%,测试显色情况,观察有机溶剂甲醇对显色的影响。

干扰实验:取1ml胶体金溶液于离心管中,调节pH值为7.0左右,标记5μg/ml,用重悬液5倍浓缩重悬,0.5mg/ml二抗划C线,0.3mg/ml甲基对氧磷包被原划T线,用4种配方的人工尿样稀释标准品,测试显色情况观察盐离子浓度对显色情况的影响。

## 2 结果与分析

### 2.1 抗体浓度的测定

由图3得 $A_{260nm}=1.6726$ ,  $A_{280nm}=1.2879$ 。

蛋白含量(mg/ml)=( $1.45 \times 1.2879 - 0.74 \times 1.6726$ ) $\times 3=0.63$ (mg/ml)

根据胶体金的颜色,可以略估计制得的金颗粒的大小,可用分光光度计扫描 $\lambda_{max}$ 来估计金颗粒的粒径。

由图4得在波长525nm处有最大吸收峰,金粒子大小为30nm左右。

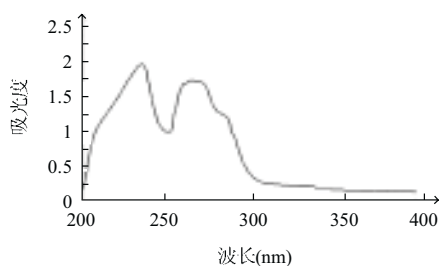


图3 甲基对氧磷抗体紫外图谱  
Fig.3 UV spectrum of methyl paraoxon antibody

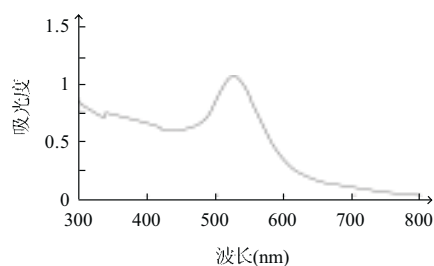


图4 纳米金紫外图谱  
Fig.4 UV spectrum of golden nanoparticles

## 2.2 试纸条各条件优化结果



图5 最佳标记pH值优化  
Fig.5 Optimization of pH value for labeling

图5中标记pH值从左到右依次为6.0、7.0、8.0、9.0。由图可知，各pH值条件下显色效果差异不显著，对结果影响不大，因此可将标记pH值定为7.0做以下测试。



图6 最佳抗体标记量  
Fig.6 Optimization of antibody amount for labeling

图6中标记量从左到右依次为10、8、5  $\mu\text{g/ml}$ 。根据显色情况，10  $\mu\text{g/ml}$  标记显色最深，但抑制不完全；8  $\mu\text{g/ml}$  标记抑制不完全，T线可辨；5  $\mu\text{g/ml}$  标记显色

与前两个浓度相当且抑制完全，因此确定最佳标记量为5  $\mu\text{g/ml}$ 。



图7 最佳重悬量优化  
Fig.7 Optimization of re-suspension for labeling

图7中重悬量从左至右依次为20、10、5倍浓缩。根据测试结果20倍浓缩显色最深但抑制不完全，10倍浓缩显色清晰，5倍浓缩显色清晰可辨，选择显色清晰且浓度最低的浓度，因此最佳重悬量为5倍浓缩。



图8 T线浓度优化  
Fig.8 Optimization of line T concentration

图8中T线浓度从左到右分别为0.6、0.5、0.3  $\text{mg/ml}$ 。根据显色结果，3个浓度梯度显色清晰度差异不显著，选择浓度低且显色清晰的T线浓度0.3  $\text{mg/ml}$ 。

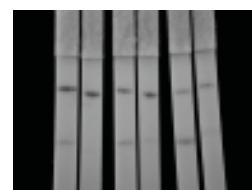


图9 C线浓度优化  
Fig.9 Optimization of line C concentration

图9中C线浓度从左到右依次为1.0、0.5、0.3  $\text{mg/ml}$ 。根据显色情况，1.0  $\text{mg/ml}$  显色最清晰，其次为0.5  $\text{mg/ml}$  显色清晰且抑制完全，0.3  $\text{mg/ml}$  显色相对模糊，选择浓度较低且显色清晰的浓度0.5  $\text{mg/ml}$ 。

图10中，样品pH值从左至右依次为5.0、6.0、7.0、8.0、9.0、10.0。据显色情况，不同各pH值条件下C线和T线显色效果差异不显著，且抑制完全，判断样品pH值对结果判断无影响。

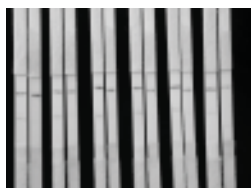


图 10 添加样品 pH 值优化

Fig.10 Optimization of pH value of determined samples



图 11 有机溶剂的影响

Fig.11 Effect of organic solvents on color response

图 11 中甲醇含量从左至右依次为 0、5%、10%、20%、30%。根据显色结果各浓度梯度下试纸条显色清晰，且抑制完全，可知有机溶剂甲醇对结果判断影响不显著。



图 12 干扰实验

Fig.12 Examination of interferences

图 12 中样品稀释液从左至右依次为 PBS、人工尿样配方一、配方二、配方三、配方四。根据显色结果，配方一 T 线有扩散，配方三金标释放不完全，但显色均清晰可辨，配方二、配方四对显色无影响，因此样品中其他离子对测试结果影响不显著。

### 3 结 论

根据各条件下优化结果得出最优参数如下：最佳标记 pH 值为 7.0；最佳抗体标记量为  $5 \mu\text{g/ml}$ ；最佳重悬量为 5 倍浓缩；C 线浓度  $0.5\text{mg/ml}$ ；T 线浓度  $0.3\text{mg/ml}$ ；样品垫处理液为 pH7.4 PBS( $0.4\%$  Brij-35)；重悬液：蔗糖 10%，BSA 0.1%，Tween-20 0.1%；待测样品中有机溶剂、离子浓度、pH 值等对测试结果影响均不显著。

### 参考文献：

- [1] 刘爱红, 张琳. 农药残留与食品安全[J]. 安徽农业科学, 2007, 35(13): 4017-4018.
- [2] 杨晓艳, 李敏, 王丽, 等. 胶体金免疫层析测试条快速诊断鼠疫应用研究[J]. 中国地方病学杂志, 2006, 25(5): 568-570.
- [3] 汤天曙, 薛毅. 我国食品安全现状与对策[J]. 食品工业科技, 2002(2): 4-8.
- [4] 李书国, 李雪梅, 陈辉, 等. 动物性食品安全与 HACCP[J]. 食品科学, 2003, 24(8): 217-220.
- [5] 南庆贤, 吕玲. 动物性食品安全性问题及其对策[J]. 中国家禽, 2002, 24(22): 6-8; 11.
- [6] 张建勋, 崔玉兰, 从玉艳. 兽药残留的危害与兽药残留监控对策[J]. 兽药与兽管, 2004(7): 30-33.
- [7] 聂芳红, 徐晓彬, 陈进军. 食品动物兽药残留的研究进展[J]. 中国农学通报, 2006, 22(9): 71-75.
- [8] 迟玉聚, 盛宏高, 范六一. 国内外食品安全形势[J]. 中国食物与营养, 2004(6): 11-12.
- [9] 刘爱红, 张琳. 农药残留与食品安全[J]. 安徽农业科学, 2007, 35(13): 4017-4018.
- [10] McCracken R J, KEMMEDY D G. Determination of the furazolidone metabolite, 3-amino-2-oxazolidinone, in porcine tissues using liquid chromatography thermospray mass spectrometry and the occurrence of residues in pigs produced in Northern Ireland[J]. J Chromatogr B, 1997, 691: 87-94.
- [11] 叶永茂. 国际食品安全领域热点问题综述[J]. 世界标准化质量管理, 2002, 17(7): 18-21.
- [12] COOPER K M, CADDELL A, ELLIOTT C T, et al. Production and characterization of polyclonal antibodies to a derivative of 3-amino-2-oxazolidinone, a metabolite of the nitrofur furazolidone[J]. Anal Chim Acta, 2004, 520: 79-86.
- [12] CONNEELY A, NUGENT A, O'KEEFFE M. Use of solid phase extraction for the isolation and clean-up of a derivatised furazolidone metabolite from animal tissues[J]. Analys, 2002, 127: 705-709.