

实验技术与方法

苏丹红 胶体金检测试纸条的研制

任立松¹ 党荣理¹ 柳增善² 杨林¹ 郭红³

(1. 新疆军区疾病预防控制中心,新疆 乌鲁木齐 830011; 2 吉林大学人兽共患病研究所,吉林 长春 130062; 3. 兰州军区乌鲁木齐总医院,新疆 乌鲁木齐 830000)

摘要:目的 研制苏丹红 胶体金快速检测试纸条。方法 用柠檬酸三钠法制备 20 nm胶体金颗粒,以抗苏丹红 单克隆抗体进行标记,组装胶体金试纸条,并进行测试。结果 实验室条件下,试纸条能够快速检测到食品中的苏丹红,最低检测浓度为 50 ng/L。结论 与其他检测方法相比,该检测方法快速、简便。

关键词:苏丹红;胶体金;试纸条;抗体,单克隆

中图分类号: R155.5 **文献标识码:** A **文章编号:** 1004-8456(2010)01-0036-04

Preparation of Colloidal Gold Strips for Rapid Detection of Sudan

REN Li-song, DANG Rong-li, LU Zeng-shan, YANG Lin, GUO Hong

(Xinjiang Command Center for Disease Control and Prevention, People's Liberation Army, Xinjiang Urumqi 830011, China)

Abstract: Objective To prepare colloidal gold strip for rapid detection of Sudan . **Method** Preparing 20 nm colloidal gold particles with trisodium citrate, labeling them with anti-Sudan McAb, and installing strips and testing in lab **Results** Under laboratory conditions, Sudan in food samples could be tested by colloidal gold strips in few minutes The lowest concentration for detection was 50 ng/L **Conclusion** In comparison with other detection methods, the colloidal gold strip method is more rapid, friendly in use and relatively inexpensive

Key words: Sudan ; Gold Colloid; Strip; Antibodies, Monoclonal

苏丹红 作为一种非法食品添加剂,对人体危害巨大^[1-3]。我国已经采取多种方式阻断不法商贩在食品中添加苏丹红,常用分光光度法^[4]、高效液相色谱^[5]等检测方法检测食品中的苏丹红,这些检测方法具有程序繁琐、费用昂贵、样品前处理复杂等不利因素,给监管带来较大困难。目前,在市场上还经常能见到违规添加现象。为进一步提高苏丹红 检出率,简化检测手段,在获得抗苏丹红 单克隆抗体的基础上,利用胶体金技术,组装了苏丹红 胶体金快速检测试纸条,在较短时间内,可以检测食品中最低浓度 50 ng/L的苏丹红,为快速检测苏丹红 做了进一步探索。

1 材料与方

1.1 主要试剂与仪器

氯金酸、柠檬酸三钠、牛血清白蛋白、碳酸钾、氯化钠、氯仿、二氯二甲基硅烷、辛酸、硫酸铵(分析

纯, Sigma公司);羊抗鼠 IgG-HRP(鼎国公司)。

透射电镜(日立公司);紫外分光光度计(NUNC公司)。

1.2 材料

硝酸纤维素膜(NC膜),玻璃纤维膜,样品垫,吸水垫,PVC底板等均为 Millipo公司产品。

1.3 试剂配制

(1) 5%二甲基二氯硅烷氯仿溶液:量取 25 ml 甲基二氯硅烷,475 ml 氯仿溶液,通风橱内混匀。

(2) 1%柠檬酸三钠:取 450 ml的去离子水倒入烧杯中,准确称量 5 g柠檬酸三钠加入其中搅拌至全溶,定容到体积 500 ml,现配现用。

(3) 1 mol/L 碳酸钾:取 90 ml的去离子水倒入烧杯中,准确称量 13.824 g碳酸钾加入其中搅拌至全溶,定容到体积 100 ml,4℃保存。

(4) 10% BSA:取 80 ml的去离子水倒入烧杯中,准确称量 10 g BSA加入其中搅拌至全溶,准确称取 0.02 g叠氮钠加入搅拌至全溶,定容到体积 100 ml,4℃保存,有效期 6个月。

(5) 0.02 mol/L Tris(pH 8.2):取 0.242 g Tris, 0.85 g氯化钠,用 0.01 mol/L的盐酸调 pH至 8.2,定

收稿日期:2009-10-12

作者简介:任立松 男 博士 助理研究员 研究方向为食品安全

E-mail: renlisong93@163.com

容至 100 ml

(6) 0.05 mol/L PBS (pH 7.2): 取 15.4 g Na_2HPO_4 , 1.4 g NaH_2PO_4 , 8.5 g NaCl 溶于 800 ml 蒸馏水中,定容至 1000 ml,混匀后室温保存。

(7) 0.05 mol/L PBS (pH 8.0): 取 34.5 g NaH_2PO_4 , 8.9 g Na_2HPO_4 , 0.85 g NaCl ,定容至 100 ml,混匀后室温保存。

1.4 方法

1.4.1 抗体纯化 辛酸硫酸铵法^[6] 用 4 倍体积的醋酸钠缓冲液 (60 mmol/L, pH 4.0) 稀释腹水,用 0.1 mmol/L 的氢氧化钠调 pH 至 4.5。将辛酸 (33 $\mu\text{l}/\text{m}$ 血清) 逐滴加入样品中,边滴加边搅拌,滴加完后继续搅拌 30 min, 8000 r/min 离心 30 min。取上清液按体积比 10:1 与 0.1 mol/L PBS 混合,用 0.1 mol/L 的氢氧化钠调 pH 至 7.4。缓慢加入 4 放置的硫酸铵 (0.227 g/ml) 搅拌 30 min, 4 静止放置过夜。次日 6000 r/min 离心 15 min, 弃上清液,将沉淀悬浮于 PBS (起始抗体体积的 1/10) 中。悬浮液用 0.01 mol/L PBS 4 透析 48 h, -20 保存备用。为了最大限度保持活性,以上所有的搅拌和操作过程均在 4 条件下进行。

1.4.2 胶体金的制备 按照 Frens^[7]法,用柠檬酸三钠还原法制备胶体金。

在 1 L 的圆底烧瓶 (带有回流装置) 中加入 500 ml 0.01% HAuCl_4 溶液,加热煮沸,立即加入 1% 柠檬酸三钠 10 ml 溶液,继续煮沸 5~6 min,溶液颜色由浅黄 蓝色 深蓝 红色,至溶液的颜色完全变为透明的酒红色时,停止加热,冷却至室温,4 保存。

1.4.3 透射电镜评价 取制备好的胶体金溶液 1 滴,附在有 Formvar 膜的铜网上,片刻后用滤纸吸走多余的液体,空气自然干燥,在透射电镜下观察胶体金颗粒大小是否均匀一致,有无椭圆形及多角形。

1.4.4 抗体与胶体金结合的最佳浓度的选择 用蛋白梯度法测定抗体与胶体金结合的最佳浓度:将待标单克隆抗体溶液在 4 条件下用 10 000 r/min 离心 30 min,去除多余的盐离子及蛋白残物,取上清液测蛋白浓度。取 10 支 ep 管,各加入 500 μl 胶体金溶液,分别加入 0、5、10、15、20、25、30、35、40、45 μl 纯化单抗,放置 5 min 后,加入 10% 氯化钠溶液 50 μl ,混匀后静置 2 h,观察颜色变化。颜色保持红色的最小抗体用量为最小抗体浓度,也就是抗体与胶体金结合的最佳浓度。实际制备工作中,抗体浓度往往在最小浓度的基础上增加 20%~30%。

1.4.5 抗体与胶体金结合最佳 pH 值 采用胶体金梯度法^[8]测定最佳 pH 值 取 10 支 1.5 ml ep 管,

各加入上述制备的胶体金溶液 500 μl ,用 0.2 mol/L 的碳酸钾溶液将其 pH 值分别调节到 6.0、6.5、7.0、7.5、8.0、8.5、9.0、9.5 和 10.0。每管加入 20 μl 纯化单克隆抗体,混合均匀,室温放置 10 min 后加入 10% 的氯化钠溶液 50 μl ,静置 2 h,观察溶液颜色变化。以呈均匀的透明紫红色溶液管的 pH 值为最佳 pH 值。

1.4.6 胶体金探针的纯化 将标记好的胶体金溶液以 1200 r/min 离心 20 min,弃去凝聚的胶体金颗粒形成的沉淀。然后再以 12 000 r/min 离心 1 min,弃去上清液,用 300 μl 0.2 mol/L TBS 溶解沉淀,加入 10 μl 0.5 mg/m 叠氮钠防腐,置 4 保存。

1.4.7 检测试纸条的制作 将 NC 膜裁成 4 cm \times 2.5 cm 大小,取 10 μl A_{Su-OVA} (20 $\mu\text{g}/\text{ml}$) 均匀包被在检测线处,取 10 μl 羊抗鼠 IgG-HRP (0.8 mg/ml) 均匀包被在质控线处自然风干。膜干燥后完全浸泡于含 1% BSA 的 pH 7.2 的 PBS 中,以封闭纤维膜的残余吸附能力,浸泡 30 min,4 真空抽干待用。将标记好的抗体溶液 1 稀释后按 50 $\mu\text{l}/\text{cm}^2$ 的量均匀滴加在 4 mm \times 4 cm 的玻璃纤维上,37 干燥 30 min 后取出,作为结合垫。裁取 4 cm \times 3 cm 的吸水纸作吸收垫。4 cm \times 2.8 cm 的玻璃纤维作样品垫。将以上各部分首尾相连,粘贴在 4 cm \times 8 cm 的 PVC 底板上。用剪刀将纸张剪成 5 mm 宽,与干燥剂一起装入铝箔袋,密封储存。如图 1 所示。

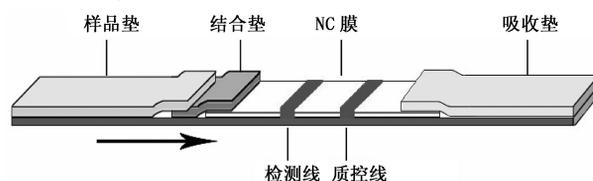


图 1 试纸条组装模式图

1.4.8 试纸条的检测 将苏丹红 溶液滴加 4~5 滴在样品垫上,静置 20 min 后观察 NC 膜的显色情况。每次检测需设阴性对照试纸条,待测样品检测结果与对照试纸条比较后判断结果。

1.4.9 评价实验 灵敏度及检测范围 用乙腈稀释苏丹红 标准品至 1 mg/ml,再用重蒸水稀释,使其终浓度为: 5、10、25、50、75、100、1000 和 10 000 ng/ml。用试纸条检测的标准方法检测,每个浓度重复 5 次,根据实验结果判断试纸条的检测灵敏度及检测范围。

特异性试验 用乙腈稀释苏丹红、苏丹红、苏丹红、用乙醇稀释甲基红、酚红、胭脂红等与其结构类似或常用于食品添加剂的红色素标准品至 1 mg/ml,再用重蒸水稀释,使其终浓度为: 0、5、10、

50、100和 500 ng/ml, 用试纸条检测的标准方法检测, 每个浓度重复 5 次, 判断试纸条的检测特异性。

2 结果

2.1 胶体金的鉴定

2.1.1 颜色鉴定 采用柠檬酸三钠还原法制备胶体金, 制备过程中, 颜色由浅黄逐步变为红色, 稳定在酒红色, 颜色透明、均匀, 透光性好。

2.1.2 透射电镜鉴定 透射电镜下观察到胶体金颗粒大小基本一致, 没有菱形、三角形金颗粒。

2.2 抗体与胶体金结合的最佳浓度

由图 2 确定实际蛋白用量为每毫升胶体金溶液中添加 35 μg 抗体蛋白。

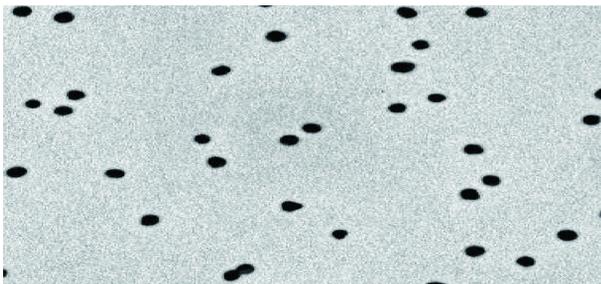


图 2 胶体金电镜图 (40000 \times)

2.3 最佳标记 pH 值

根据溶液颜色变化判断最佳 pH 值, 经观察, pH 8.5 以后各管溶液呈透明紫红色。因此, 胶体金标记的最佳 pH 为 8.5。

2.4 纯化后的胶体金探针鉴定

透射电镜观察标记后的胶体金颗粒 (见图 3), 大小基本一致, 散布均匀, 在金颗粒周围有灰白色晕环, 表明颗粒表面吸附有抗体蛋白质, 由此推断, 单克隆抗体标记到胶体金颗粒上。

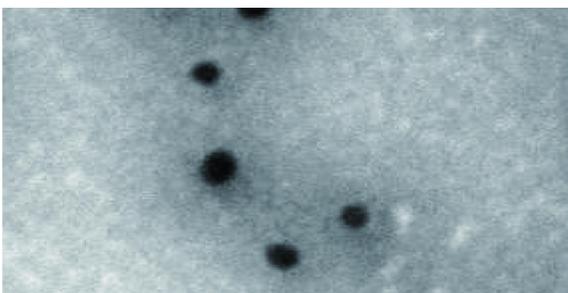


图 3 纯化后胶体金探针电镜鉴定结果 (40000 \times)

2.5 灵敏度及检测范围

灵敏度及检测范围实验的结果如表 1 所示。从中判定苏丹红 快速检测试纸条的最低检测浓度为 50 ng/ml。

2.6 特异性检测试验结果

结果表明, 该试纸条检测苏丹红、苏丹红、苏丹红、用乙醇稀释甲基红、酚红、胭脂红均为阴

性, 说明具有较好的特异性。

表 1 苏丹红 快速检测试纸条灵敏度试验

样品苏丹红 含量 (ng/ml)	1号	2号	3号	4号	5号
0	-	-	-	-	-
5	-	-	-	-	-
10	+	-	+	-	+
25	+	-	-	+	-
50	+	+	+	+	+
75	+	+	+	+	+
100	+	+	+	+	+
1000	+	+	+	+	+
10000	+	+	+	+	+

2.7 渗透速度和均一性试验

分别用同一批次的不同试纸条检测同一样品, 从滴加样品开始计时, 到出现质控线记录时间, 以确定试纸条的渗透速度和均一性。随机抽取 5 批, 10 条/批, 结果最快为 15 min, 最慢为 25 min, 平均为 20 min, 表明试纸条有较好的均一性。

3 讨论

本实验采取的是标记抗体, 检测抗原, 用羊抗鼠二抗作为控制线。结果判定: 检测线、控制线均出现为阳性; 仅有检测线出现为阴性; 无线条出现试纸条失败。影响试纸条失败的因素很多, 本实验多次出现试纸条不稳定的现象, 一是与手工操作误差较大、单克隆抗体多次冻融、效价发生变化、在制备胶体金垫时封闭效果不理想有关; 二是与胶体金颗粒的制备、抗体与胶体金结合以及胶体金浓度有关。

胶体金颗粒的大小与抗体标记对实验结果有重要影响。根据不同的实验需要, 对胶体金颗粒的大小有不同要求, 常用的为 18 ~ 20 nm、30 nm、40 nm 等。本实验依据李朝辉等^[9]在实验中的经验数据, 在胶体金煮沸后迅速加入一定体积的 1% 柠檬酸三钠, 经电镜确认, 所获得的胶体金颗粒大小在 18 ~ 20 nm 之间, 分布均匀。与单克隆抗体的结合中分别采用不同的 pH 和抗体蛋白量结合, 确定了 pH 和抗体蛋白浓度, 并用电镜再次确定, 金颗粒周围有浅灰色光晕, 颗粒分布均匀。判定抗体与胶体金的最佳浓度, 当每毫升胶体金溶液中抗体添加量等于或大于 30 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 胶体金抗体蛋白络合物的颜色不再发生较大的变化时, 再增加 20% ~ 30% 即为待标记抗体蛋白的实际用量, 最终确定抗体蛋白用量为 35 μg 。在试纸条的装配过程中, 由于本实验室没有相应设备, 从金标抗体的喷涂, 检测线抗原的包被、玻璃纤维膜装载到试纸条的组装, 均采用手工操作, 产生一定的人为误差, 对检测结果有影响。在研究中我们发现, 试纸条对低浓度的苏丹红 有较好的

识别,但对于高浓度,则无法识别,可能与苏丹红易吸附到纤维上,影响其扩散有关。

参考文献

- [1] MARIE S, BEFEKADU A, PAVEL A. Reduction of azo dyes during in vitro percutaneous absorption [J]. Federation of European Biochemical Societies, 1988, 232: 387-390.
- [2] 卫生部,国家标准化管理委员会. GB 2760—1996 食品添加剂使用卫生标准 [S].
- [3] European Commission. Health and consumer protection directorate general, directorate d-food safety: Production and distribution chain, analysis and dosage of the colorants sudan and bixin in chili powder and pepper base products [S]. 1999-03.
- [4] 余孔捷,杨方,卢声宇. 分光光度法测定红辣椒及其产品中苏丹红 [J]. 中国卫生检验杂志, 2004, 14: 596.
- [5] 张裕平,张毅军,袁倬斌,等. 高效液相色谱法测定红辣椒制品中的苏丹红 [J]. 生命科学仪器, 2005, 3 (3): 25-28.
- [6] 张龙翔,张庭芳,李金媛. 生化实验方法和技术 [M]. 北京:高等教育出版社, 1997: 119-132.
- [7] FRENS G. Controlled nucleation for the regulation of the particle size in monodisperse gold suspensions [J]. Nature Physical Science, 1973, 241: 20-23.
- [8] 高云涛,吴立生. 胶体金探针的制备 [J]. 云南民族学院学报(自然科学版), 1999 (1): 41-43.
- [9] 李朝辉. 食物中毒菌多联融合毒素免疫学检测方法的建立 [C]. 长春:吉林大学, 2007: 64-78.

消息

第一届全国食品安全风险评估专家委员会成立大会在京召开

为加强我国食品安全风险评估工作,进一步提高我国食品安全水平,卫生部根据《食品安全法》的规定,组建了由 42 名委员组成的第一届全国食品安全风险评估专家委员会,并于 12 月 8 日在京举行第一届全国食品安全风险评估专家委员会成立大会。卫生部部长陈竺出席会议并讲话,会议由卫生部副部长陈啸宏主持,全国人大教科文卫委员会副主任任茂东出席会议,国务院有关部门、国家食品安全风险评估专家委员会主任委员陈君石和 42 名委员参加了会议。

卫生部新闻办公室
二〇〇九年十二月八日

第一届食品安全国家标准审评委员会成立大会在京召开

第一届食品安全国家标准审评委员会成立大会 1 月 20 日在京举行。第一届食品安全国家标准审评委员会由 10 个专业分委员会的 350 名委员和工业和信息化、农业、商务、工商、质检、食品药品监管等 20 个单位委员组成,主要职责是审评食品安全国家标准,提出实施食品安全国家标准的建议,对食品安全国家标准的重大问题提供咨询,承担食品安全标准其他工作。委员会下设食品产品、微生物、生产经营规范、营养与特殊膳食食品、检验方法与规程、污染物、食品添加剂、食品相关产品、农药残留、兽药残留 10 个专业分委员会。卫生部部长陈竺担任主任委员,卫生部副部长陈啸宏担任常务副主任委员,农业部副部长陈晓华、中国疾病预防控制中心陈君石院士、中国农业科学院茶叶研究院陈宗懋院士、中国检验检疫科学研究院庞国芳院士和中国疾病预防控制中心主任王宇同志担任副主任委员,陈君石院士兼任审评委员会技术总师。

中华人民共和国卫生部
二 一 年一月二十日