

硝苯地平免疫胶体金探针的制备

宋翔^{1,2}, 王云贵², 黄登宇^{2*}

(1. 山西大学生物技术研究所, 太原 030006; 2. 山西大学食品药品快速检测中心, 太原 030006)

摘要: **目的** 优化硝苯地平药物的免疫胶体金探针的制备条件。**方法** 采用柠檬酸三钠还原法制备胶体金溶液, 采用紫外分光光度法在 400~700 nm 处测定胶体金溶液吸光度, 判断胶体金颗粒大小。调整标记胶体金溶液 pH、抗体蛋白量以及复溶液等因素, 试制试纸条并进行加标验证实验, 确定制备免疫胶体金探针的最优条件。

结果 实验制备胶体金颗粒大小在 20~40 nm; 最佳制备条件为: 单抗标记 pH 为 9.0, 单抗标记量为 5.0 μ L, 复溶液为 0.5 mol/L Tris(pH 9.0, 含 0.5% Tween20)。经加标实验验证, 试纸条的检测灵敏度可以达到设计要求。

结论 硝苯地平免疫胶体金探针的制备条件优化, 可为下一步制作高质量的免疫胶体金试纸条提供技术准备, 可应用于对食品中非法添加硝苯地平的快速检测。

关键词: 硝苯地平; 免疫层析试纸条; 免疫胶体金

Preparation of nifedipine immune colloidal gold probe

SONG Xiang^{1,2}, WANG Yun-Gui², HUANG Deng-Yu^{2*}

(1. Institute of Biotechnology, Shanxi University, Taiyuan 030006, China; 2. The Food and Drug Safety Rapid Inspection Center, Shanxi University, Taiyuan 030006, China)

ABSTRACT: Objective To optimize the preparation conditions of immune colloidal gold probe for detection of nifedipine drugs. **Methods** Colloidal gold solution was prepared by sodium citrate reduction method, and the absorbance of colloidal gold was determined by ultraviolet spectroscopy (UV) at 400~700 nm, so as to observe the size of colloidal gold. By adjustment of the pH value of labeled colloidal gold solution, the amount of antibody protein and the reconstituted solution to determine the optimal conditions for preparing immune colloidal gold probes, test strip was tested and spiked experiment was verified. **Results** The size of prepared gold particles was 20~40 nm. The best preparation conditions for immune colloidal gold probe were as follows: the pH value of labeled monoclonal antibodies was 9.0, the labeled amount of monoclonal antibodies was 5.0 μ g/mL, and complex solution was 0.5 mol/L Tris (pH 9.0, containing 0.5% Tween20). After verification of standard addition recovery experiment, the sensitivity of the test strip could meet the design requirements. **Conclusion** The optimization of preparation conditions of immune colloidal gold probe for detection of nifedipine can provide technical preparation for making high quality immune colloidal gold strip, which can be applied for rapid detection of nifedipine illegally added in food.

KEY WORDS: nifedipine; immunochromatographic strip; immune colloidal gold

*通讯作者: 黄登宇, 博士, 副教授, 主要研究方向为食品卫生检测。E-mail: Huangdy1110@126.com

*Corresponding author: HUANG Deng-Yu, Ph.D, Associate Professor, The Food and Drug Safety Rapid Inspection Center, No.92, Wucheng Avenue, Xiaodian District, Taiyuan 030006, China. E-mail: Huangdy1110@126.com

1 引 言

硝苯地平是一种常见的降血压药物, 人服用后可导致血压短时间内显著下降, 但降压幅度与速度难以掌控, 服用不当或可导致重要生命器官血液灌注压力和血流量下降, 也可导致全身血流重新分布, 造成心脏或者脑部血管相对缺血, 严重的可引发死亡^[1]。我国规定禁止向食品中添加药物成分, 但是一些不法商家为了赚取更多的非法利润, 在保健食品中添加明令禁止的药物成分, 给消费者带来伤害和威胁^[2]。

如何在现场快速筛选出食品中违法添加的药物, 是新常态下对基层食品安全执法工作提出的新要求, 目前急需建立针对这些非法添加药物成分的快速、准确的快速筛查方法。本研究旨在确定硝苯地平免疫胶体金探针的制备条件, 研制出一种操作简便、反应快速、结果准确的硝苯地平免疫胶体金层析试纸条, 为基层食药监管人员的现场快速检测提供帮助^[3]。

2 材料与方法

2.1 仪器与试剂^[4,5]

2.1.1 仪 器

UV-1800 紫外分光光度计(日本岛津公司); 冷冻离心机(美国 Eppendorf 公司); M3 basic 涡旋仪(德国 IKA 公司); TP-213 电子天平(美国 DENVER Instrument 公司); Topolino 磁力搅拌(德国 IKA 公司); DHG-9140A 电热恒温干燥箱(上海精宏实验设备有限公司)。

2.1.2 试 剂

氯金酸、柠檬酸三钠、吐温(Tween)-20、聚乙二醇 20000(均为分析纯, 国药集团化学试剂有限公司), 牛血清蛋白 BSA(美国 Sigma 公司), 超纯水(Milli-Q 超纯水系统制备), 其他抗原抗体物质(实验室自制)。

2.2 实验方法

2.2.1 制备胶体金溶液^[6,7]

100 mL 0.1%氯金酸溶液倒入圆底烧瓶, 以 300 r/min 匀速旋转加热至沸腾, 注入 2 mL 1%柠檬酸三钠溶液, 100 °C 保持 10 min, 自然冷却至室温, 制备好的胶体金保存于 4 °C。

2.2.2 判断胶体金大小

紫外扫描胶体金, 400~700 nm 处测定其吸光度, 判断其颗粒大小范围。

2.2.3 标记胶体金抗体

(1)确定最佳标记 pH^[8,9]

1.5 mL EP 管, 注入 1 mL 胶体金溶液, 以 1 mol/L K_2CO_3 调节至不同 pH(7.5、8、8.5 和 9), 加入 6 μ L 的硝苯地平抗体(1.0 mg/mL), 混合均匀后静置 4 h, 以 10000 r/min 离心 10 min, 取上清液观测测定 OD_{530} 。以上清液 pH 为

横坐标、 OD_{530} 为纵坐标作标准曲线, 以吸收最大的 pH 作为最佳 pH。

(2)确定最佳标记蛋白量

1.5 mL EP 管中加入 1 mL 胶体金溶液, 以 1 mol/L K_2CO_3 调节 pH 至 9.0, 分别取 5、10、15、20 μ L 1.0 mg/mL 纯化后抗体加入反应体系中, 混匀后静置 4 h, 以 10000 r/min 离心 10 min。去除上清液, 加入 1 mL 复溶液, 2500 r/min 涡旋 30 s, 观察上清液及沉淀。出现最少沉淀的为最佳标记条件, 若有数个同等条件, 则加入蛋白最少量的条件为最佳标记量^[10-12]。

(3)确定最佳复溶液

在 1 mol/L Tris 溶液(pH 为 7.5~8)中, 分别加入 0.5% 及 1%的不同活性剂(BSA、PEG8000、PEG2000、Tween 20)作为复溶液。在经过离心的胶体金沉淀中加入 1 mL 复溶液, 2500 r/min 涡旋 1 min, 观察上清液及沉淀。沉淀最少、分散时间最短的复溶液为最佳^[13]。

2.2.4 制作试纸条并进行灵敏度测试

根据实验调整确定的标记抗体、包被抗原浓度及二抗的标记浓度喷涂制作试纸条。取硝苯地平标准品, 以阴性未含硝苯地平降压类保健食品作为基质, 加入 0、1.0 mg/L 不同浓度硝苯地平进行加标实验, 实验平行进行 10 次。若 T 线比 C 线颜色更深, 结果为阴性(-); 若 T 线与 C 线颜色浅, 则结果为阳性(+); 若发现 C 线无颜色, 则测试结果为失效(/)^[14]。

3 结果与分析

3.1 胶体金颗粒大小

胶体金的紫外吸收光谱见图 1, 由图 1 可知, 实验制备的胶体金的紫外图谱最大吸光度值约在 529 nm, 胶体金的颜色为深红色。

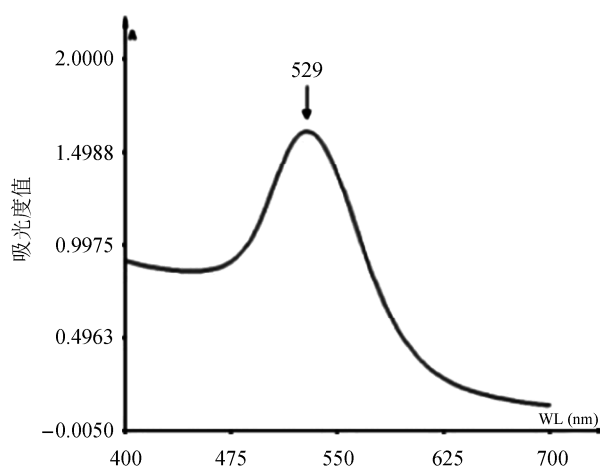


图 1 胶体金的紫外吸收光谱

Fig. 1 The UV spectrum of colloid gold

3.2 最佳标记的 pH

不同 pH 下制备的胶体金颜色也不同, 在 pH 分别为 7.5、8、8.5、9 的条件下, 对应所制备的胶体金颜色由深至浅, pH 为 8.5 及 9 时形成的胶体金较好, 颜色为酒红色。测试其波长在 529 nm 的吸光度。如图 2 所示, pH 为 9 时, 其吸收值最大, 溶液中的胶体金含量最多, 为最佳标记 pH。

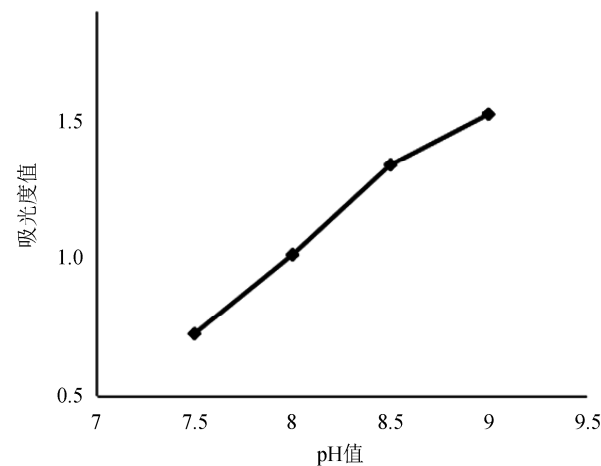


图 2 pH 对胶体金吸光度的影响
Fig. 2 The effect of pH on absorption of colloid gold

3.3 最佳抗体蛋白标记量的确定

抗体蛋白标记含量为 5、10 和 15 μL 时, 胶体金的颜色变化不明显, 当抗体含量为 20 μL 时, 胶体金颜色变为灰褐色, 即出现死金现象, 说明抗体的量过大, 使得胶体金团聚, 因此抗体标记量不应超过 15 μL 。随后再加入 5~15 μL 抗体, 以 10000 r/min 分离 10 min, 去除上清, 并加注 1 mL 重悬液(使用 1% Tween 20)涡旋, 比较溶液颜色。当抗体为 15 μL 时, 胶体金溶液未能完全分散, 说明蛋白量过多, 而 5 μL 和 10 μL 的胶体金可完全重新分散, 因此标记量合适。最终确定优选抗体标记量为 5.0 μL 。

3.4 最佳复溶液的确定

复溶液的合理选择可以使标记后胶体金得到最大程度的回收。往离心后的胶体金沉淀中分别加入等体积的不同复溶液, 涡旋后比较不同复溶液中胶体金的分散情况, 所需时间最短、沉淀最少且无“挂壁”现象(即胶体金黏附于管壁)的复溶液为最佳。

比较含量为 0.5%~1%的 BSA, PEG8000, PEG2000 及 Tween 20 的 0.5 mol/L Tris 复溶液, 如表 1 所示, 效果最佳的为 0.5% 及 1%的 Tween 20。因此选用 0.5 mol/L Tris(pH=9.0, 含 0.5% Tween 20)为最佳复溶液。

3.5 试纸条灵敏度测试

标记抗体、包被抗原及二抗决定了试纸条的灵敏度, 需要根据目标的检测限配合来调。本研究将硝苯地平的目标检测限定为 1 mg/L。经过调试, 确定 C 线(二抗喷涂量)为 9.0 μL , T 线(包被抗原喷涂量)为 7.0 μL , 而胶体金标记抗体量为 5.0 μL 。根据确定的条件少量制作胶体金试纸条, 利用加标实验对其灵敏度进行测定。

取阴性降压类保健食品, 分别按表 2 加入硝苯地平进行免疫层析测试。所有实验平行进行 10 次。

可见试纸条在加标量为 1.0 mg/L 时均可以报为阳性, 报阳率为 100%。因此, 该试纸条的灵敏度可达到目标设定的 1.0 mg/L。

4 讨 论

胶体金颗粒大小不均匀将会严重影响快速检测的成败, 仅 5%的胶体金不均匀即会影响检测结果, 使检测不具备重现性, 使蛋白与胶体金短时间内发生积聚与凝集, 造成检测结果假阳性。金颗粒的大小在很大程度上决定了试纸条质量的高低。胶体金颗粒直径大于 20 nm 才会在检测线或控制线上聚集, 对于大多数的免疫检测来说, 最适的粒子大小是 20~40 nm。本实验制备的胶体金的紫外图谱最大吸收峰约在 529 nm, 颜色为深红色, 颗粒大小在 20~40nm 之间。

表 1 不同活性剂的复溶效果
Table 1 Reconstitution effects of different active agents

时间(min)	BSA		PEG8000		PEG2000		Tween 20	
	0.50%	1%	0.50%	1%	0.50%	1%	0.50%	1%
1	+	+	+	+	+	+	++	++
2	+	++	+	++	+	+	+++	+++
3	+	+++	++	++	+	++	+++	+++
4	++	+++	++	+++	++	++	+++	+++
5	++	+++	++	+++	++	++	+++	+++

注: “+++”表示试纸条显色清晰程度

表 2 灵敏度测试(n=10)
Table 2 Sensitivity test (n=10)

添加浓度(mg/L)	0	1.0
检测结果	-	+
	-	+
	-	+
	-	+
	-	+
	-	+
	-	+
	-	+
	-	+

胶体金标记蛋白主要受离子浓度、pH 值和蛋白量等因素影响。当 pH 值低于蛋白质等电点(proteins isoelectric, pI)时, 蛋白质带正电荷, 胶体金带负电荷, 二者易通过静电结合形成聚合物; 当 pH 大于 pI 时, 蛋白质与胶体金颗粒同带负电荷相互排斥不宜结合^[15,16]。本实验通过设置不同 pH 梯度和抗体蛋白浓度梯度制备免疫金探针, 以确定最优制备条件。本研究确定免疫胶体金探针的最优制备条件为 pH 9, 抗体标记量 5 μL, 复溶液 0.5 mol/L Tris(pH=9.0, 含 0.5%Tween 20), 此优化条件的确定可为制作高质量的硝苯地平免疫胶体金试纸条打下坚实基础。

参考文献

[1] 丁宝月, 屠婕红, 薛磊冰, 等. UPLC-MS/MS 法快速测定降压类中成药及保健食品中非法添加 34 种化学药的研究[J]. 中草药, 2015, 46(5): 688-696.
Ding BY, Tu JH, Xue LB, *et al.* Rapid determination of 34 chemicals illegally added into Chinese patent medicines and health foods with blood pressure lowering function by UPLC-MS/MS [J]. Chin Tradit Herb Drugs, 2015, 46(5): 688-696.

[2] 李亚楠, 王瑞, 孙元媛, 等. 直接竞争酶联免疫法测定吠喃妥因代谢物[J]. 食品安全质量检测学报, 2015, (9): 3723-3729.
Li YN, Wang R, Sun YY, *et al.* Determination of nitrofurantion metabolite by direct competitive enzyme-linked immunosorbent assay [J]. J Food Saf Qual, 2015, (9): 3723-3729.

[3] 冯梁. 磺胺二甲嘧啶胶体金免疫层析试纸条的研制[D]. 北京: 中国农业大学, 2005.
Feng L. Development of a one step strip test for the detection of sulfadimidine residues in swine urine [D]. Beijing: China Agricultural University, 2005.

[4] 潘嘉慧, 田峻, 赵亮亮, 等. 氯霉素抗原的制备及其在免疫胶体金快速检测中的应用[J]. 广东化工, 2015, 42(1): 39-40.
Pan JH, Tian J, Zhao LL, *et al.* Preparation of chloramphenicol antigen and its application of rapid detection of chloramphenicol residue by

colloidal gold-based immunochromatography [J]. Guangdong Chem Ind, 2015, 42(1): 39-40.

[5] 刘亦娟, 徐晓丽, 孙金生. 哈维氏弧菌胶体金免疫层析试纸条的制备[J]. 水产学杂志, 2015, (2): 6-11.
Liu YJ, Xu XL, Sun JS. Development of a colloidal gold immunochromatographic test strip for detection of *Vibrio harveyi* [J]. Chin J Fish, 2015, (2): 6-11.

[6] 曹海林. 莱克多巴胺胶体金试纸条的研制[D]. 厦门: 集美大学, 2014.
Cao HL. Study on the ractopamine colloidal gold test strip [D]. Xiamen: Jimei University, 2014.

[7] Chiao DJ, Shyu RH, Hua CS, *et al.* Colloidal gold-based immunochromatographic assay for detection of botulinum neurotoxin type B [J]. J Chromatogr B, 2004, (809): 37-41.

[8] 王丽哲, 赵瑜, 唐慧林, 等. 新霉素半定量胶体金试纸条的研制[J]. 食品科学, 2014, (8): 309-312.
Wang LZ, Zhao Y, Tang HL, *et al.* Development of semiquantitative colloidal gold test strip for neomycin [J]. Food Sci, 2014, (8): 309-312.

[9] 肖琛, 李培武, 唐章林, 等. 氟戊菊酯残留胶体金免疫层析试纸条的研制[J]. 化学试剂, 2011, 33(8): 675-679.
Xiao C, Li PW, Tang ZL, *et al.* Development of gold immunochromatography strip for fenvalerate residue [J]. Chem Reag, 2011, 33(8): 675-679.

[10] 陈善真, 林礼锬, 王志花, 等. 利用多肽抗原建立同时检测 CSFV 和 PRRSV 抗体的胶体金免疫层析方法[J]. 动物医学进展, 2014, (11): 1-5.
Chen SZ, Lin LK, Wang ZH, *et al.* Establishment of colloidal gold immuno-chromatographic assay for detecting antibodies of PRRSV and CSFV based on coupling polypeptide antigens [J]. Prog Vet Med, 2014, (11): 1-5.

[11] 杜玉玲. 磺胺类药物多残留 ELISA 快速检测试剂盒与胶体金免疫层析试纸条的初探[D]. 乌鲁木齐: 新疆农业大学, 2013.
Du YL. Development of ELISA methods and kits for rapid detection and a colloidal gold immunochromatographic strip for detection of sulfonamides [D]. Urumchi: Xinjiang Agricultural University, 2013.

[12] Oliver C. Conjugation of colloidal gold to proteins [J]. Methods Mol Biol, 1999, 115: 331-336.

[13] 赵越. 掺假原料乳快速检测试纸条的研究[D]. 天津: 天津商业大学, 2010.
Zhao Y. The research of gold immunochromatographic strip for adulterate raw milk [D]. Tianjin: Tianjin University of Commerce, 2010.

[14] 林晓丽, 饶辉, 熊勇华, 等. 胶体金试纸条快速检测食品中磺胺二甲嘧啶残留[J]. 食品科学, 2010, (24): 366-369.
Lin XL, Rao H, Xiong YH, *et al.* Rapid detection of sulfadimidine residue in food by colloidal gold strips [J]. Food Sci, 2010, (24): 366-369.

[15] 孙素玲, 张忠诚, 许贝贝, 等. 恩诺沙星抗体与胶体金结合的最佳浓度和最佳 pH 的确定[J]. 动物医学进展, 2014, (4): 59-62.
Sun SL, Zhang ZC, Xu BB, *et al.* Determination of optimal concentration and pH of colloidal gold combined with enrofloxacin antibody [J]. Prog Vet Med, 2014, (4): 59-62.

[16] BrewerSH, GlommWR, Johnson MC, *et al.* Probing BSA binding to citrate-coated gold nanoparticles and surfaces [J]. Langmuir, 2005, (21): 9303-9307.

(责任编辑: 姚菲)

作者简介



宋 翔, 主要研究方向为蛋白质化学与工程。
E-mail: 213634334@qq.com



黄登宇, 博士, 副教授, 主要研究方向为食品卫生检测。
E-mail: Huangdy1110@126.com

“果蔬加工与质量安全控制”专题征稿函

随着我国经济的飞速发展,我国农业发展也迎来新的机遇和挑战。近年来,通过农业经济结构调整和农业标准化体系建设,农产品质量有较大提高,但也存在安全问题,果蔬是重要的经济作物,在保证果蔬的营养的同时,果蔬产品的质量与安全也越来越受到重视,控制好其质量与安全具有重要的实际意义。

鉴于此,本刊特别策划了“**果蔬加工与质量安全控制**”专题,专题主要围绕**果蔬加工(加工前处理、加工新方法、新工艺、新技术等)**; **果蔬生产控制(农药残留、重金属超标等)**和**采后控制(加工、包装和储运保鲜等过程中的产品质量控制)**等或您认为本领域有意义的问题进行论述,计划在**2016 年 11 月**出版。

本刊主编吴永宁研究员和编辑部特邀请您为本专题撰写稿件,以期进一步提升该专题的学术质量和影响力。综述、实验报告、研究论文均可,请在**2016 年 10 月 10 日**前通过网站或 E-mail 投稿。我们将快速处理并优先发表。

感谢您的参与和支持!也谢谢您帮忙转发,祝好!盼回复!

投稿方式:

网站: www.chinafoodj.com

E-mail: jfoodsq@126.com

《食品安全质量检测学报》编辑部