

胶体金免疫层析技术

在食品检测中的应用

吴刚,姜瞻梅,霍贵成,田波*

(东北农业大学乳品科学教育部重点实验室,东北农业大学食品学院,黑龙江哈尔滨 150030)

摘要: 主要介绍免疫层析技术和胶体金标记技术的原理及其在食品安全与质量控制方面的应用,并对其将来的发展方向进行了探讨。

关键词: 免疫层析,胶体金,检测

Abstract: The principles of immunochromatography and colloidal gold marked technology and their applications in the regions of food safety and quality control was mainly introduced. And the development direction in future was discussed.

Key words: immunochromatography; colloidal gold; detection

中图分类号: TS207.3 文献标识码: A

文章编号: 1002-0306(2007)12-0216-03

免疫层析(Immunochromatography, IC)技术是20世纪80年代发展起来的一种将免疫技术和色谱层析技术相结合的快速免疫分析方法^[1]。其原理是以条状纤维层析材料为固相,借助毛细作用使样品溶液在层析条上泳动,同时,使样品中的待测物与层析材料上针对待测物的受体(如抗体或抗原)发生高特异、高亲和性的免疫反应,层析过程中免疫复合物被富集或截留在层析材料的一定区域(检测带),通过酶促显色反应或直接使用可目测的着色标记物(如胶体金),短时间(5~10min内)便可得到直观的实验结果。它不需进行结合标记物与游离标记物的分离,省去了繁琐的加样、洗涤步骤。因而这种分析技术操作简单快速,分析结果清楚,易于判断,且无须仪器(或只需简单仪器),非常适用于食品的现场快速检测。

1 免疫层析类型

按照免疫层析中抗原与抗体结合方式的不同,

收稿日期:2007-02-05 *通讯联系人

作者简介:吴刚(1984-),男,硕士研究生,研究方向:食品生物技术。

基金项目:黑龙江省教育厅科学技术研究项目(11511024);乳品科学教育部重点实验室主任基金项目(KLDS2006-0153)。

可将免疫层析分为两类:非竞争性免疫层析和竞争性免疫层析。

1.1 非竞争性免疫层析

即双抗体夹心法。将着色标记物(一般采用胶体金)与待测抗原的特异性抗体(Ab1)相偶联,并将其沉积在结合区上。当样品(尿、血浆、饮料等)加到样品区后,由于毛细管作用,样品迅速浸透结合区,带有标记物的Ab1被溶解,并在上部材料吸水涨力的牵引下随着样品溶液沿膜条向前移动。若样品中存在待测抗原,它就会和带有标记物的Ab1结合形成Ag-Ab1。随后,样品通过固相化有捕获抗体(一般是待测抗原的另一表位特异性抗体Ab2)的检测线(test line)区域时,Ag-Ab1复合物被捕获,形成Ab1-Ag-Ab2复合物。一部分未与Ab1结合的样品继续前移,通过固相化有抗Ab1抗体(Ab3)的质控线(control line)区域,形成Ab3-Ab1复合物。这种方式通常用于检测带有多个抗原位点的分析,常用于致病细菌、大分子蛋白质等的检测等。

1.2 竞争性免疫层析

将着色标记物与待测抗原的特异性抗体(Ab1)相偶联,沉积在结合区。而检测区处固相化的是待测抗原或待测抗原的类似物。若样品中含有待测抗原,则样品中的抗原和带有标记物的Ab1形成Ag-Ab1复合物。随后在通过固相化有待测抗原或其类似物的检测区时,由于竞争抑制,不再发生反应,检测线处不显色;样品继续前移,Ag-Ab1复合物被固相化在质控线处的抗Ab1抗体(Ab2)所结合,形成Ab1-Ag-Ab2复合物,使质控线显色。这种方式适用于检测带有单一抗原表位的小分子抗原,常用于农兽药残留、违禁药物的检测等。

2 胶体金免疫层析技术

胶体金(colloidal gold)是氯金酸(chloroauric acid)的水溶液,是氯金酸在还原剂如白磷、柠檬酸三钠等的作用下,聚合成特定大小的金颗粒,并由于静电作用成为一种稳定胶体溶液。由于胶体金颗粒具有高电子密度的特性,且颗粒聚集达到一定密度时

(即达到 10^7 个/ mm^2), 出现肉眼可见的粉红色斑点, 因而可以作为免疫层析试验的指示物。

胶体金的制备是利用还原剂还原氯金酸进行制备, 目前常用的还原剂有: 白磷、乙醇、过氧化氢、硼氢化钠、抗坏血酸、柠檬酸三钠、鞣酸等。最常用的制备方法为柠檬酸三钠还原法^[4]。该方法制得的胶体金颗粒的大小跟柠檬酸三钠的用量有关, 柠檬酸三钠用量越少, 胶体金颗粒直径越大。

胶体金标记蛋白的制备, 实质上是蛋白质等生物大分子物质在 pH 大于或等于被标记蛋白质的等电点时, 被吸附到胶体金颗粒表面的包被过程。待标记蛋白的离子浓度应尽可能的小, 标记前可用双蒸水透析以除去多余的离子。制备好的胶体金-蛋白质复合物需进一步纯化, 以除去未结合的蛋白或胶体金颗粒, 一般采用超速离心法和凝胶过滤法^[5]。

3 胶体金免疫层析技术在食品检测中的应用

胶体金免疫层析技术在医学上应用较多, 在食品检测领域的应用在近几年才发展起来。国外在这方面起步较早, 现在已经有成熟的产品问世, 而国内的研究主要集中在疾病诊断领域, 对在食品检测方面应用的研究才刚起步。本文主要介绍国内在该领域研究进展。

3.1 在食品质量控制领域的应用

食品的主要成分是蛋白质、糖类、脂肪、水分、矿物质、维生素, 其中大部分有机高分子物质, 如蛋白质、生物活性肽、多糖、脂类, 都可以用免疫学方法进行检测。对于那些不需要精确定量检测, 但需要快速得出检测结果的成分分析, 胶体金免疫层析技术尤为适用, 此类检测多要求进行半定量分析。国内在这一领域的研究较少, 只有在保健食品检测中有所应用。

牛初乳是奶牛正常分娩后最初几天分泌的乳汁, 含有大量的非营养性功能组分, 具有极高的保健价值。而初乳中 IgG 含量与这些生物活性物质含量具有一定的正相关性, 所以 IgG 含量成为评价牛初乳及其制品生物活性的良好指标。2006 年李忠秋、刘春龙等^[6]采用胶体金标记的标准牛 IgG 作为竞争抗原, 将其包被在试纸条的结合垫上, 将自制的兔抗牛 IgG 抗体固相化在硝酸纤维素膜的检测区。通过牛乳样品中的 IgG 跟胶体金标记的标准牛 IgG 竞争结合 IgG 抗体的结合位点, 来反映样品中 IgG 的水平。该操作需要 15min, 可以进行简单的半定量分析, 具有良好的特异性。

3.2 在食品安全检测领域的应用

目前, 一些不法商贩在食品行业竞争过程中采用不正当手段, 食品中致病菌超标、农药兽药等的残留、违禁物质的添加等问题层出不穷, 给食品安全问题带来了严重的隐患。胶体金免疫层析技术操作简单、检测时间短、便于现场操作, 可以为现场执法带来科学依据。目前, 国内的研究主要集中在这一领域, 此类检测通常需要进行定性分析或简单的半定

量分析。

3.2.1 食品中有害微生物的检测 食品中有害微生物的超标, 主要与食品的卫生问题有关, 食品中常见的致病菌有大肠杆菌、金黄色葡萄球菌、沙门氏菌、布氏杆菌、霍乱弧菌等^[7-14]。

2006 年王静等^[7]利用双抗体夹心法检测大肠杆菌 O157, 胶体金标记的 EHEC O157 单抗作为一抗包被于结合垫, EHEC O157 抗血清作为二抗固相化于硝酸纤维素膜的检测带上, 质控带上固相化的是羊抗鼠 IgG。此方法检测时间为 15min, 大肠杆菌 O157 的最低检出浓度为 1×10^5 cfu/mL。

邵晨东等人^[11]于 2005 年将抗沙门氏菌 O₃ 抗原的特异性单克隆抗体 4-7-7、羊抗鼠 IgG, 以条带状分别包被于硝酸纤维素膜的检测带和质控带上, 用胶体金标记另一株单抗 3-47-0, 并将其吸附于结合垫上, 组合成试纸条, 检测沙门氏菌 O₃ 抗原。该试纸条对沙门氏菌 O₃ 抗原的最小检出量 4×10^5 cfu/条。

3.2.2 食品中农药、兽药、生物毒素残留的检测 食品中农药、兽药、生物毒素残留严重威胁着消费者的健康, 近年来公众对此类问题越来越关注。食品中残留的农药、兽药和生物毒素大多为小分子物质, 属于半抗原, 制备抗体时需要将其与大分子蛋白(如人血清白蛋白、卵清白蛋白等)进行偶联, 制备人工抗原。

磺胺甲噁唑(sulfamethoxazole, sinomin, SMZ, 又名新诺明)是兽医临床上常用的磺胺类药物, 主要用于动物全身感染, 其在动物性食品中的残留可以引起细菌耐药性增加, 也可导致长期食用含该药物残留食品的消费者患皮炎、白细胞减少、溶血性贫血等疾病。2006 年, 张明等人^[15]采用 SMZ-HSA(磺胺甲噁唑-人血清白蛋白)免疫新西兰白兔制得抗体, 并用胶体金进行标记, 将其包被于结合垫上。将 SMZ-OVA(磺胺甲噁唑-卵清白蛋白)固相化在检测带上, 试纸条无质控带。样品中的 SMZ 与 SMZ-OVA 竞争结合抗体, 由于试纸条只有检测带, 所以每次检测必须设阴性对照试纸条, 检测时阴性呈现出红色条带, 而阳性无红色条带。该方法对 SMZ 标准溶液的灵敏度达到 50ng/mL, 整个检测反应在 5~10min 内完成。

黄曲霉毒素 B₁(Aflatoxins B₁, AFB₁)是黄曲霉菌和寄生曲霉的二次代谢产物, 毒性大致癌力强, 理化性质稳定, 能污染食品, 对人类健康构成威胁。赵晓联等^[16]于 2005 年采用竞争免疫层析技术检测食品中的黄曲霉毒素 B₁, 抗 AFB₁ 单克隆抗体作金标抗体, 黄曲霉毒素 B₁-牛血清白蛋白作检测带, 羊抗鼠 IgG 作质控带, 制得试纸条。该试纸条的最低检测限为 2.5ng/mL。

另外, 李余动等人^[17]对检测氯霉素残留的研究, 陈小旋^[18]对猪肉中盐酸克伦特罗残留的检测研究都采用了胶体金免疫层析技术, 得到了能够快速方便的检测试纸条。

3.2.3 食品中违禁药物的检测 近年来, 一些食品

经营者为诱使食用者成瘾,牟取暴利,无视国家食品卫生的相关法律法规,将罂粟壳添加到火锅汤料、调料等食品中,危害了公众健康。罂粟壳中含有吗啡、罂粟碱、可卡因等成分,因而可以以此类物质作为判断食品中是否掺入罂粟壳的指标。这类物质同样属于小分子物质,对其的检测方法与检测农药、兽药等的残留类似。2004年,任辉^[19]采用竞争免疫层析法检测食品中的吗啡,最小检测质量为45 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 。方邢有等人^[20]于2005年同样采用竞争性免疫层析技术检测食品中的罂粟碱,得到的试纸条检出限为0.2 $\mu\text{g}/\text{mL}$,正确检出率约为97%。

4 展望

目前,国内这一领域的研究仍处于实验室阶段,国内还没有国产的成型产品。而市售的免疫层析产品均系进口国外散件国内组装或直接代销的国外产品。由于食品快速检测产品的市场巨大,在国内开展这一领域的研究,尽快研制出多品种、高质量的免疫层析产品,不仅可避免国内资金的大量外流,并且对改善食品质量与安全,提高我国国民健康水平,将起到不容忽视的作用。

进一步提高检测灵敏度、实现多元检测、实现定量或半定量检测是将来免疫层析分析发展的三个方向。灵敏度的提高无疑会拓宽免疫层析分析的检测范围,而采用信号放大系统或采用一些新标记物,并结合一些相应的简单检测仪器是比较有希望的途径之一。对于多元检测的实现,可采用多膜复合或单膜多元受体固定两种方式,这对于检测某些具有联检意义的物质,如 α -乳清蛋白/ β -乳球蛋白的比值,具有很大的应用价值。对于定量、半定量检测,一个途径是采用酶促反应显色的层析方式,通过层析条的显色高度进行定量;另一个途径是在精确控制样品加入量的条件下,通过确定检测带的显色时间对待测物进行定量。这种定量方式以样品中待测物含量与检测带显色时间之间存在一定对应关系为基础。另外,还可通过复合多条不同灵敏度层析条的方式,通过观察各层析条的显色情况,将待测物含量确定于某一浓度区间,从而实现半定量检测。总之,对免疫层析分析方法的要求是多方面的,在满足检测快速而简便的条件下,应尽可能提高检测的特异性和敏感度,减少假阴性和假阳性,这对于用于自检(self-test)的免疫层析产品是尤为重要的。作为一种简单快速的检测技术,免疫层析将会在食品检测领域中得到充分的发展和广泛的应用。

参考文献:

[1] Glad C, Grubb AO. Immunocapillary migration with enzyme-labeled antibodies: rapid quantification of C-reactive protein in human plasma[J]. *Anal Biochem*, 1981, 116: 335-340.
[2] Zuk RF, Ginsberg VK, Houts T. Enzyme immunochromatography: a quantitative immunoassay requiring no instrumentation[J]. *Clin Chem*, 1985, 31: 1144-1150.

[3] Diamandis EP, Christopoulos TK. The biotin-streptavidin system: principles and applications in biotechnology[J]. *Clin Chem*, 1991, 37: 625-636.
[4] Frans G. Controlled nucleation for the regulation of the particle size in monodisperse gold suspensions[J]. *J Nature*, 1973, 241: 20-22.
[5] 王培之,徐可沂,皮国华. 胶体金免疫结合实验在医学检验中的应用[J]. *中华医学检验杂志*, 2000, 23(5): 308-309.
[6] 李忠秋,刘春龙,王君伟,等. 免疫胶体金半定量检测牛初乳IgG含量方法的建立及初步应用[J]. *中国奶牛*, 2006(1): 12-15.
[7] 王静,陈维娜,胡孔新,等. 大肠杆菌O157胶体金免疫层析快速筛查方法的建立[J]. *卫生研究*, 2006, 35(4): 439-441.
[8] Shyu RH, Shyu HF, Liu HW, et al. Colloidal gold based immunochromatographic assay for detection of ricin[J]. *Toxicon*, 2002, 40(3): 255-258.
[9] Takeda T, Yamagata K, Youhida Y, et al. Evaluation of immunochromatography based rapid detection kit for fecal *Escherichiacoli* O157[J]. *Kansenshogaku Zasshi*, 1998, 72(8): 834-839.
[10] 杜玉萍,陈清,俞守义,等. 胶体金免疫层析法检测金黄色葡萄球菌的初步研究[J]. *热带医学杂志*, 2006, 6(6): 650-652.
[11] 邵景东,陈飞,肖国平, O. 群沙门氏菌胶体金检测试剂盒的研制[J]. *检验检疫科学*, 2005, 15(3): 30-32.
[12] Yoshimasu MA, Zawistowski J. Application of rapid dot blot immunoassay for detection of *Salmonella enterica* serovar enteritidis in eggs, poultry and other foods[J]. *Appl Environ Microbiol*, 2001, 67(1): 459-461.
[13] Abe C, Hirano K, Tomiyama T. Simple and rapid identification of the *Mycobacterium tuberculosis* complex by immunochromatographic assay using anti-MPB64 monoclonal antibodies[J]. *J Clin Microbiol*, 1999, 37(11): 3693-3697.
[14] 王中民,李君文,王新为. 胶体金免疫层析法快速检测沙门氏菌[J]. *微生物学免疫学进展*, 2004, 32(4): 36-38.
[15] 张明,吴国娟,陆彦,等. 免疫胶体金法检测磺胺甲噁唑残留的研究[J]. *中国兽药杂志*, 2006, 40(4): 17-19.
[16] 赵晓联,龚燕,孙秀兰,等. 金标免疫层析法检测黄曲霉毒素B1的方法[J]. *粮油食品科技*, 2005, 13(6): 49-51.
[17] 李余动,张少恩,吴志刚,等. 胶体金免疫层析法快速检测氟霉菌素残留[J]. *中国食品卫生杂志*, 2005, 17(5): 416-419.
[18] 陈小旋. 盐酸克伦特罗单克隆抗体制备及其免疫层析试纸条的研制[D]. 福建农林大学硕士学位论文, 2005. 47-61.
[19] 任辉. 免疫胶体金层析法快速检测食品中吗啡[J]. *中国公共卫生*, 2004, 20(4): 488.
[20] 方邢有,高志贤. 胶体金免疫层析法检测罂粟碱的研究[J]. *分析实验室*, 2005, 24(12): 1-4.

胶体金免疫层析技术在食品检测中的应用

作者: 吴刚, 姜瞻梅, 霍贵成, 田波
作者单位: 东北农业大学乳品科学教育部重点实验室, 东北农业大学食品学院, 黑龙江哈尔滨, 150030
刊名: 食品工业科技 **ISTIC** **PKU**
英文刊名: SCIENCE AND TECHNOLOGY OF FOOD INDUSTRY
年, 卷(期): 2007(12)
被引用次数: 10次

参考文献(20条)

1. Glad C;Grubb AO [Immunocapillarymigration with enzyme-labeled antibodies:rapid quantification of C-reactive protein in human plasma](#)[外文期刊] 1981
2. Zuk RF;Ginsberg VK;Houts T [Enzyme immunochromatography:a quantitative immunoassay requiring no instrumentation](#) 1985
3. Diamandis EP;Christopoulos TK [The biotin-\(strept\)avidin system:principles and applications in biotechnology](#) 1991
4. Frans G [Controlled nucleation for the regulation of the particle size in monodisperse gold suspensions](#) 1973
5. 王培之;徐可沂;皮国华 [胶体金免疫结合实验在医学检验中的应用](#)[期刊论文]-[中华医学检验杂志](#) 2000(05)
6. 李忠秋;刘春龙;王君伟 [免疫胶体金半定量检测牛初乳IgG含量方法的建立及初步应用](#)[期刊论文]-[中国奶牛](#) 2006(01)
7. 王静;陈维娜;胡孔新 [大肠杆菌O157胶体金免疫层析快速筛查方法的建立](#)[期刊论文]-[卫生研究](#) 2006(04)
8. Shyu RH;Shyu HF;Liu HW [Colloidal gold based immunochromatographic assay for detection of ricin](#)[外文期刊] 2002(03)
9. Takeda T;Yamagata K;Youhida Y [Evaluation of immunochromatography based rapid detection kit for fecal Escherichiacoli O157](#) 1998(08)
10. 杜玉萍;陈清;俞守义 [胶体金免疫层析法检测金黄色葡萄球菌的初步研究](#)[期刊论文]-[热带医学杂志](#) 2006(06)
11. 邵景东;陈飞;肖国平 [O9群沙门氏菌胶体金检测试剂盒的研制](#)[期刊论文]-[检验检疫科学](#) 2005(03)
12. Yoshimasu MA;Zawistowski J [Application of rapid dot blot immunoassay for detection of Salmonella enterica serovar enteritidis in eggs,poultry and other foods](#)[外文期刊] 2001(01)
13. Abe C;Hirano K;Tomiya T [Simple and rapid identification of the Mycobacterium tuberculosis complex by immunochromatographic assay using anti-MPB64 monoclonal antibodies](#) 1999(11)
14. 王中民;李君文;王新为 [胶体金免疫层析法快速检测沙门氏菌](#)[期刊论文]-[微生物学免疫学进展](#) 2004(04)
15. 张明;吴国娟;陆彦 [免疫胶体金法检测磺胺甲噁唑残留的研究](#)[期刊论文]-[中国兽药杂志](#) 2006(04)
16. 赵晓联;龚燕;孙秀兰 [金标免疫层析法检测黄曲霉毒素B1的方法](#)[期刊论文]-[粮油食品科技](#) 2005(06)
17. 李余动;张少恩;吴志刚 [胶体金免疫层析法快速检测氯霉素残留](#)[期刊论文]-[中国食品卫生杂志](#) 2005(05)
18. 陈小旋 [盐酸克伦特罗单克隆抗体制备及其免疫层析试纸条的研制](#)[学位论文] 2005
19. 任辉 [免疫胶体金层析法快速检测食品中吗啡](#)[期刊论文]-[中国公共卫生](#) 2004(04)
20. 方邢有;高志贤 [胶体金免疫层析法检测罂粟碱的研究](#)[期刊论文]-[分析试验室](#) 2005(12)

本文读者也读过(7条)

1. 祁光宇, 智晓莹, 任维维, 黄银军, 牟克斌, 刘学荣, 王宇, 蒋韬, QI Guangyu, ZHI Xiaoying, REN Weiwei, HUANG

Yinjun, MU Kebin, LIU Xuerong, WANG Yu, JIANG Tao 胶体金免疫层析技术在动物源性食品中的应用[期刊论文]-东北农业大学学报2010, 41(4)

2. 林彤, 独军政, 丛国正, 邵军军, 高闪电, 常惠芸, 谢庆阁 胶体金标记免疫层析技术的最新应用进展[期刊论文]-安徽农业科学2010, 38(16)
3. 朱丽, 袁慧 胶体金免疫层析技术及其在霉菌素检测中的应用[期刊论文]-中国饲料2009(23)
4. 刘军涛, 郭宗慧, 刘春秀, 岳伟伟, 周爱玉, 蔡新霞, LIU Jun-tao, GUO Zong-hui, LIU Chun-xiu, YUE Wei-wei, ZHOU Ai-yu, CAI Xin-xia 免疫层析试条量化检测系统研究[期刊论文]-微纳电子技术2007, 44(7)
5. 邹程焯, ZOU Cheng-han 免疫胶体金技术及其在肉类安全检测中的应用[期刊论文]-肉类工业2010(8)
6. 朱丽, 袁慧 胶体金免疫层析技术及其在霉菌毒素检测中的应用[会议论文]-2009
7. 方莹 免疫胶体金技术及其在微生物检测中的应用[期刊论文]-中国卫生检验杂志2006, 16(11)

引证文献(10条)

1. 李超伟, 黄进, 周彦, 魏兰英, 姜昌富 胶体金免疫层析技术在感染性疾病诊断和食品卫生检测中的应用[期刊论文]-国际医学寄生虫病杂志 2011(1)
2. 刘道峰, 邓省亮, 赖卫华 新型层析快速检测技术及其在食品安全中的应用[期刊论文]-食品与机械 2011(6)
3. 宋宏新, 符海英, 薛海燕, 张玥, 邹联柱 两种胶体金制备方法的比较研究[期刊论文]-河南工业大学学报(自然科学版) 2012(1)
4. 周妍蕾 常用生化技术在食品检测分析中的应用[期刊论文]-宁夏农林科技 2012(6)
5. 崔浩, 陈耀强, 唐勇, 向军俭, 徐霞玲, 颜露 莱克多巴胺荧光胶乳颗粒免疫层析检测法的建立[期刊论文]-分析测试学报 2011(7)
6. 刘道峰, 邓省亮, 赖卫华, 夏骏 莱克多巴胺荧光微球免疫层析检测方法的建立[期刊论文]-食品与机械 2012(1)
7. 孙红英, 方菲, 赵露晶, 邢国杰, 沈鹤柏 神经元特异性烯醇酶和癌胚抗原胶体金免疫层析联合检测[期刊论文]-现代生物医学进展 2011(7)
8. 魏东, 刘英 氟喹诺酮类药物残留多元快速检测试纸条的研制[期刊论文]-核农学报 2012(9)
9. 曹丰晶, 胡玉才, 王卓, 张伟, 蒋兴宇 金纳米颗粒在疾病诊断和食品检测领域的研究进展[期刊论文]-中国材料进展 2012(6)
10. 王蔚芳, 李青梅, 郭军庆, 雷霖霖 胶体金免疫层析快速检测技术及其在水产养殖业中的应用前景[期刊论文]-渔业科学进展 2010(3)

本文链接: http://d.wanfangdata.com.cn/Periodical_spgykj200712070.aspx