

胶体金免疫层析法定量检测孔雀石绿

山 珊¹, 彭 涛¹, 杨万春², 刘春梅², 熊勇华¹, 赖卫华^{1,*}

(1.南昌大学 食品科学与技术国家重点实验室, 江西 南昌 330047;

2.江西中德生物工程有限公司, 江西 南昌 330029)

摘 要: 基于竞争抑制反应原理, 制备孔雀石绿胶体金免疫层析试纸条, 通过胶体金读取仪, 读取试纸条上检测线(T线)及质控线(C线)的吸光度, 建立孔雀石绿免疫层析定量检测方法。使用胶体金读取仪在多个时间段对不同质量浓度的孔雀石绿标准品进行检测。以标准品的不同质量浓度为横坐标, 分别以T线吸光度、T/C值和T/(T+C)值为纵坐标建立3种检测模式。结果表明: 检测时间为10min时, T线吸光度与标准品质量浓度关系曲线的 $R^2=0.9438$, 变异系数为1.6%~8.2%; T/C值与标准品质量浓度关系曲线的 $R^2=0.9811$, 变异系数为0.4%~3.7%; T/(T+C)值与标准品质量浓度关系曲线的 $R^2=0.9916$, 变异系数为0.3%~2.2%, 和其前两种模型比较, 最后一种方法的线性关系好, 变异系数小, 检测灵敏度为 $3\mu\text{g/L}$, 是一种较为理想的检测模型。

关键词: 孔雀石绿; 免疫层析法; 定量检测方法

Development of Colloidal Gold Lateral Flow Assay for Quantitative Detection of Malachite Green

SHAN Shan¹, PENG Tao¹, YANG Wan-chun², LIU Chun-mei², XIONG Yong-hua¹, LAI Wei-hua^{1,*}

(1. State Key Laboratory of Food Science and Technology, Nanchang University, Nanchang 330047, China;

2. Jiangxi Zodolabs Biological Engineering Co. Ltd., Nanchang 330029, China)

Abstract: Based on competitive binding immunoassay, a colloidal gold lateral flow strip for the quantitative detection of malachite green was developed by reading the absorbance of test (T) and control (C) lines with a test strip reader. Different concentrations of malachite green standard were detected with the test strip reader at different times of reaction. Three different detection models were proposed by plotting the absorbance of T line, T/C and T/(T + C) against the concentration of standard, respectively. At 10 min of reaction, the linear correlation coefficient (R^2) between the concentration of standard and the absorbance of T line was 0.9438 with coefficient of variation (CV, $n = 3$) of 1.6%–8.2%, whereas the r values for T/C and T/(T + C) were 0.9811 and 0.9916 and the CV values were 0.4%–3.7% and 0.3%–2.2%, respectively. The T/(T + C) model exhibited better linearity and smaller CV, and its sensitivity was $3\mu\text{g/L}$.

Key words: malachite green; lateral flow assay; quantitative detection method

中图分类号: TS207.5

文献标志码: A

文章编号: 1002-6630(2013)16-0160-04

doi:10.7506/spkx1002-6630-201316032

孔雀石绿(malachite green, MG)又名碱性绿、盐基块绿、孔雀绿, 属三苯甲烷类染料, 曾作为杀菌剂、杀虫剂和消毒剂被广泛用于水产养殖业^[1]。由于孔雀石绿在鱼体内和环境残留时间长, 并有致突变、致畸和致癌的危险性^[2], 欧盟、美国以及部分东亚国家均已禁止将孔雀石绿用作渔类的抗真菌药物, 我国也将孔雀石绿列为食品动物禁用的兽药^[3]。但由于孔雀石绿价格低廉、防治鱼病效果良好, 同时由于目前对孔雀石绿检测手段的限制, 孔雀石绿在水产养殖、水产品运输及贮存过程中仍被广泛滥用。

检测孔雀石绿可用高效液相法^[4-7]、液质联用法^[8-9]、分光光度法^[10]、电化学法^[11-12]、表面增强拉曼散射法^[13-14]、毛细管电泳法^[15]和酶联免疫吸附法^[16]等检测方法, 这些方法虽然准确、重复性好、适用于定量检测, 但是存在成本高、操作繁琐、设备昂贵、操作人员需专业培训和检测周期长等缺点, 难以满足在基层进行现场快速筛查的要求^[17]。近年来发展迅速的胶体金试纸条检测技术, 其灵敏度高、对操作人员要求低, 并且不需要昂贵的仪器设备, 被认为是目前最具应用价值和发展潜力的分析技术之一。赵春城等^[18]使用金标免疫层析法检测水产品中

收稿日期: 2013-05-27

基金项目: “十二五” 国家科技支撑计划项目(2011BAK10B01-03)

作者简介: 山珊(1989—), 女, 硕士研究生, 研究方向为食品质量安全。E-mail: ncuskshanshan@163.com

*通信作者: 赖卫华(1968—), 男, 教授, 博士, 研究方向为食品质量安全。E-mail: talktolaiwh@163.com

的无色孔雀石绿,最低检测限为 $20\mu\text{g/L}$,但我国现行实施的关于孔雀石绿残留量的检测标准要求孔雀石绿在水产品中的检出量不得超过 $1\mu\text{g/L}$ ^[19]。桑丽雅等^[20]研制胶体金快速检测试剂板,半定量检测孔雀石绿,通过肉眼判定最低检测限为 $1\mu\text{g/L}$ 。目前采用胶体金免疫层析技术检测孔雀石绿主要停留在定性或者半定量的阶段,然而基于裸眼检测的结果伴有主观性,很难准确地对实验结果进行判定。本实验使用胶体金读取仪对孔雀石绿进行检测,分别从T线吸光度、T/C值和T/(T+C)值3个方面对样品进行快速定量分析,拟建立孔雀石绿的快速定量检测方法。

1 材料与方法

1.1 材料与试剂

孔雀石绿检测原及抗孔雀石绿单克隆抗体由本实验室制备。孔雀石绿和牛血清白蛋白(BSA)的偶联率为11.76:1,抗孔雀石绿单克隆抗体直接竞争酶联免疫吸附测定(enzyme-linked immuno sorbent assay, ELISA)法的 IC_{50} 值为 $0.3\mu\text{g/L}$,与结晶紫的交叉反应达到了100%,与无色孔雀石绿以及隐色结晶紫无交叉反应^[21]。

孔雀石绿标准品 国药集团化学试剂有限公司上海分公司;柠檬三酸钠(分析纯) 北京化工试剂公司;氯金酸(分析纯) 天津市福晨化学试剂厂;牛血清白蛋白(BSA) 中山金桥生物技术有限公司;硝酸纤维膜、金垫、吸水纸、样品垫、底板 美国Millipore公司;96孔酶标板 深圳金灿华实业有限公司。

1.2 仪器与设备

真空干燥机 上海森信实验仪器有限公司;除湿机 日本川井公司;XYZ3050型三维喷点平台、试纸条切刀 美国BioDot公司;胶体金读取仪 上海互幅科学仪器有限公司。

1.3 方法

1.3.1 孔雀石绿胶体金免疫层析试纸条的制备

1.3.1.1 金标抗体的制备及酶标板的包被

参照文献[22]进行。选用526~527nm为最大吸收峰的胶体金,用 0.2mol/L K_2CO_3 溶液调pH值至6.0。MG单抗标记终质量浓度为 $1.5\mu\text{g/mL}$ 。磁力搅拌条件下,在20mL胶体金中逐滴加入2mL超纯水稀释的MG,反应1h后,加入2mL 10%的BSA,磁力搅拌1h。 4°C 条件下8000r/min离心30min,弃上清液,沉淀用重悬液复溶,将复溶好的金标抗体包被在96孔酶标板中,包被体积为 $2.5\mu\text{L}$, 30°C 真空干燥1.5h。

1.3.1.2 免疫层析试纸条的制备

在NC膜上喷MG偶联抗原(0.2mg/mL , $0.74\mu\text{L/cm}$)和质控线(0.5mg/mL , $0.74\mu\text{L/cm}$)。喷好后于 37°C 过夜干

燥。将NC膜、胶金垫、样品垫、吸水纸及PVC底板组装好后,切成4mm宽后装卡,置于锡箔袋中,加干燥剂密封保存。

1.3.2 孔雀石绿标准品的配制

称取适量的孔雀石绿标准品,用乙腈溶解,配制质量浓度为 $1\mu\text{g/L}$ 的标准储备液。移取一定量的标准储备液,加入 $1\times\text{PBS}$ 溶液,分别配制成0、0.1、0.5、1、2、 $3\mu\text{g/L}$ 和 $5\mu\text{g/L}$ 系列梯度质量浓度的标准工作溶液,现用现配。

1.3.3 孔雀石绿免疫层析法定量检测方法的建立

将配好的标品0.1、0.5、1、2、3、 $5\mu\text{g/L}$,以 $1\times\text{PBS}$ 溶液作为阴性样本。取 $100\mu\text{L}$ 样本加入到包被了金标抗体的酶标板中,反应5min后将其吸出,加到试纸条的加样孔中,检测时间定为3、5、10、15、20、25、30、40min,用胶体金读取仪读取T线吸光度和C线的吸光度,并计算T/C值和T/(T+C)值,每个质量浓度做3个平行实验。计算3个平行样的变异系数(CV),评价试纸条之间的差异。

本实验以3种方式建立标准曲线,第1种以孔雀石绿标准品的不同质量浓度作为横坐标,以T线吸光度作为纵坐标拟合标准曲线;第2种以孔雀石绿标准品质量浓度作为横坐标,以T/C值作为纵坐标拟合标准曲线;第3种以孔雀石绿标准品质量浓度作为横坐标,以T/(T+C)值作为纵坐标拟合标准曲线。

2 结果与分析

2.1 标品质量浓度标准曲线图的绘制

图1是以标品质量浓度为横坐标、以T线吸光度为纵坐标建立的不同反应时间的标准曲线。反应时间为10min时线性较好,所得标准曲线的线性回归方程为 $y=-16.622x+230.67$, $R^2=0.9438$ 。

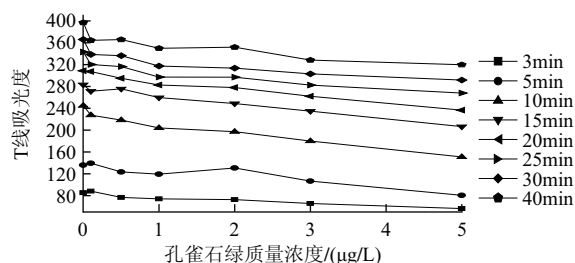


图1 不同反应时间的T线吸光度与标品质量浓度的关系

Fig.1 The relationship between the absorbance of T line and the concentration of standard at different times of reaction

图2是以标品质量浓度为横坐标、以T/C值为纵坐标建立的不同试纸条反应时间的标准曲线,反应时间为10min时,所得标准曲线的线性回归方程为 $y=-0.0614x+0.7153$, $R^2=0.9811$ 。

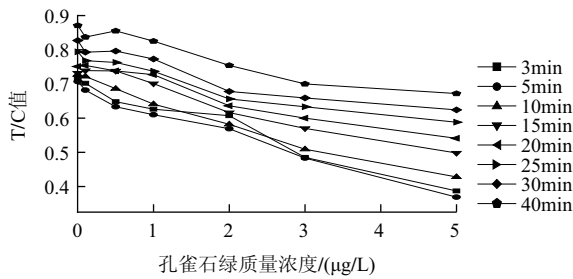


图2 不同反应时间的T/C值与标品质量浓度的关系
Fig.2 The relationship between the T/C and the concentration of standard at different times of reaction

图3是以标品质量浓度为横坐标、以T/(T+C)值为纵坐标的建的不同反应时间的标准曲线, 10min时得到的标准曲线表明标品质量浓度与T/(T+C)值呈负相关, 所得标准曲线的线性回归方程为 $y = -0.0248x + 0.4186$, $R^2 = 0.9916$ 。因此, 以T/(T+C)值为纵坐标建立的标准曲线是定量检测孔雀石绿的最优曲线模型。

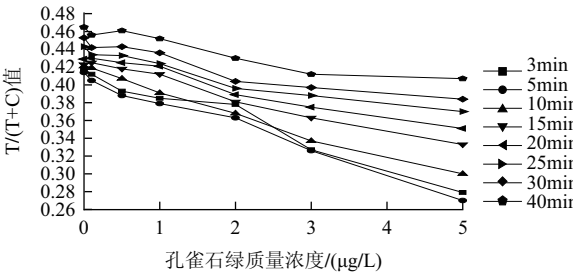


图3 不同反应时间的T/(T+C)值与标品质量浓度的关系
Fig.3 The relationship between the T/(T+C) and the concentration of standards at different times of reaction

2.2 试纸条精确度的评价

表1 不同质量浓度标品的T线吸光度重复实验结果
Table 1 Results replicate measurements of the absorbance of T line with different concentrations of standards

项	平行实验号	标品质量浓度/(µg/L)						
		0	0.1	0.5	1	2	3	5
10min	1	234.3	219.8	200.7	205.3	196.2	182.3	148.4
	2	258.4	225.9	217.5	214.7	190.5	176.7	155.2
	3	241.5	236.5	236.4	192.1	204.3	180.5	148.9
平均值		244.7	227.4	218.2	204.0	197.0	179.8	150.8
变异系数		5.1%	3.7%	8.2%	5.6%	3.5%	1.6%	2.5%

由图1~3可知, 在试纸条检测时间为10min时, T线吸光度、T/C值和T/(T+C)值均比较稳定, 线性较好, 故以10min时的T线吸光度、T/C值和T/(T+C)值的变异系数来检验试纸条之间的差异。

不同质量浓度标品的T线吸光度重复实验结果如表1所示。可以看出, 标品在试纸条上反应10min时, 变异系数为1.6%~8.2%。

不同质量浓度标品的T/C值重复实验结果如表2所

示。可以看出, 标品在试纸条上反应10min时, 变异系数为0.4%~3.7%。

表2 不同质量浓度标品的T/C值重复实验结果
Table 2 Results replicate measurements of the T/C with different concentration of standards

项	平行实验号	标品质量浓度/(µg/L)						
		0	0.1	0.5	1	2	3	5
10min	1	0.751	0.709	0.661	0.638	0.588	0.503	0.429
	2	0.720	0.752	0.682	0.644	0.559	0.505	0.419
	3	0.711	0.704	0.716	0.641	0.598	0.520	0.436
平均值		0.727	0.722	0.686	0.641	0.582	0.509	0.428
变异系数		2.9%	3.7%	4%	0.4%	3.5%	1.8%	2.0%

不同质量浓度标品的T/(T+C)值重复实验结果如表3所示。可以看出, 标品在试纸条上反应10min时, 变异系数为0.3%~2.2%。以标品的质量浓度为横坐标, 以T/(T+C)值为纵坐标的标准曲线的变异系数最小, 同时检测灵敏度可达到3µg/L。用此模型定量检测孔雀石绿重复性比另外2种曲线模型更好, 所以以T/(T+C)值为纵坐标建立的标准曲线为定量检测孔雀石绿的最佳曲线模型。

表3 不同质量浓度标品的T/(T+C)值重复实验结果
Table 3 Results replicate measurements of the T/(T+C) with different concentration of standards

项	平行实验号	标品质量浓度/(µg/L)						
		0	0.1	0.5	1	2	3	5
10	1	0.429	0.415	0.398	0.390	0.370	0.334	0.300
	2	0.419	0.429	0.405	0.392	0.359	0.336	0.296
	3	0.416	0.413	0.417	0.391	0.374	0.342	0.304
平均值		0.421	0.419	0.407	0.391	0.368	0.337	0.300
变异系数		1.7%	2.1%	1.0%	0.3%	2.2%	1.2%	1.4%

3 讨论

近年来胶体金试纸条检测技术发展迅速, 然而小分子物质的检测方法大多数是定性或半定量的, 定量检测方法研究较少。鲍蕾等^[23]使用iCheck I型食品安全定量快检仪直接定量检测植物油中的黄曲霉毒素, 最低检出限为2.51µg/kg; 王海彬^[24]研制出了黄曲霉毒素胶体金免疫层析测速仪, 建立了T/T₀值与标品质量浓度、T/(T+C)值与标品质量浓度的两种关系曲线模型, 对黄曲霉毒素进行定量检测。

基于竞争法使用胶体金读取仪检测孔雀石绿, 主要依靠试纸条上T线和C线上的颜色变化, 二者的颜色深浅主要受金标探针的量来控制, 实际应用中难以保证胶金垫上的金标探针量的均一, 即使同一批次的试纸条也会有很大的差异, CV值高达25%以上, 无法准确地进行定量检测。选择让标品与金标抗体在微孔内反应, 可以避免试纸条上金标量的差异和释放过程的差异, 使试纸条CV值减小。

本实验建立了3种不同标准曲线模型,从不同角度定量检测孔雀石绿,以 $T/(T+C)$ 值为纵坐标的模型线性关系好,变异系数小,检测灵敏度为 $3\mu\text{g/L}$,是一种较为理想的检测模型。

采用肉眼观察这个批次的胶体金试纸条的实验结果,检测灵敏度只能达到 $10\mu\text{g/L}$,因此,本实验建立的方法可以解决免疫层析分析技术灵敏度低的难题。同时避免了肉眼判定主观性强的缺点,检测结果可以保存或者上传到食品安全数据库,是快速检测方法今后发展的一个方向。

参考文献:

- [1] LIAN Ziru, WANG Jiangtao. Molecularly imprinted polymer for selective extraction of malachite green from seawater and seafood coupled with high-performance liquid chromatographic determination[J]. Marine Pollution Bulletin, 2012, 64(12): 2656-2662.
- [2] PEREZ-ESTRADA L A, AGUERA A, HEMANDO M D, et al. Photodegradation of malachite green under natural sunlight irradiation: kinetic and toxicity of the transformation products[J]. Chemosphere, 2008, 70(11): 2068-2075.
- [3] SHEN Yudong, DENG Xingfei, XU Zhenlin, et al. Simultaneous determination of malachite green, brilliant green and crystal violet in grass carp tissues by a broad-specificity indirect competitive enzyme-linked immunosorbent assay[J]. Analytica Chimica Acta, 2011, 707(1/2): 148-154.
- [4] 宫向红, 徐英江, 任传博, 等. HPLC测定水产品中孔雀石绿、亚甲基蓝、结晶紫及其代谢物的残留量[J]. 食品科学, 33(4): 144-147.
- [5] 王骏, 李建业. 高效液相色谱-荧光检测器测定水产品中孔雀石绿残留总量的研究[J]. 食品科学, 2007, 28(7): 364-367.
- [6] 邓建朝, 李来好, 杨贤庆, 等. 固相萃取-高效液相色谱-荧光检测法测定水体中的孔雀石绿[J]. 食品科学, 2012, 33(14): 150-153.
- [7] LOPEZ-GUTIERREZ N, ROMERO-GONZALEZ R, PLAZA-BOLANOS P, et al. Simultaneous and fast determination of malachite green, leucomalachite green, crystal violet, and brilliant green in seafood by ultrahigh performance liquid chromatography-tandem mass spectrometry[J]. Food Analytical Methods, 2013, 6(2): 406-414.
- [8] NEBOT C, IGLESIAS A, BARREIRO R, et al. A simple and rapid method for the identification and quantification of malachite green and its metabolite in hake by HPLC-MS/MS[J]. Food Control, 2013, 31(1): 102-107.
- [9] 冯雷, 孙文通, 李波, 等. 水产品中残留孔雀石绿和无色孔雀石绿液质联用分析方法研究[J]. 食品科学, 2009, 30(4): 193-196.
- [10] SAHRAEI R, FARMANY A, MORTAZAVI S S, et al. A nanosilver-based spectrophotometric method for determination of malachite green in surface water samples[J]. Environmental Monitoring and Assessment, 2013, 185(7): 5817-5822.
- [11] HOU Juying, BEI Feng, WANG Minglin, et al. Electrochemical determination of malachite green at graphene quantum dots-gold nanoparticles multilayers-modified glassy carbon electrode[J]. Journal of Applied Electrochemistry, 2013, 43(7): 689-696.
- [12] LIU Fengyu, YANG Xue, ZHAO Yinqi, et al. Detection of malachite green and leucomalachite green based on electrochemiluminescence of mono- and bimetallic ruthenium tris-bipyridyl complexes at an Au electrode[J]. Analytical Methods, 2013, 5(3): 660-665.
- [13] FU Wenliang, ZHEN Shujun, HUANG Chengzhi. One-pot green synthesis of graphene oxide/gold nanocomposites as SERS substrates for malachite green detection[J]. Analyst, 2013, 138(10): 3075-3081.
- [14] ZHANG Yuanyuan, LAI Keqiang, ZHOU Jinglie, et al. A novel approach to determine leucomalachite green and malachite green in fish fillets with surface-enhanced Raman spectroscopy (SERS) and multivariate analyses[J]. Journal of Raman Spectroscopy, 2012, 43(9): 1208-1213.
- [15] SUN Hanwen, QI Haijing. Capillary electrophoresis combined with accelerated solvent extraction as an improved methodology for effective separation and simultaneous determination of malachite green, crystal violet and their leuco-metabolites in aquatic products[J]. Analytical Methods, 2013, 5(1): 267-272.
- [16] 梁莉甜, 刘志国, 付云洁, 等. 隐性孔雀石绿多克隆抗体的制备及鉴定[J]. 食品科学, 2013, 34(7): 227-230.
- [17] 赵丽娜, 侯玉泽, 张改平, 等. 孔雀石绿的毒性及其残留检测研究进展[J]. 安全检测, 2011(2): 76-78.
- [18] 赵春城, 刘一军, 徐帮兴, 等. 水产品中无色孔雀石绿胶体金免疫层析法检测[J]. 中国公共卫生, 25(7): 788-789.
- [19] 白丽丽, 林正峰, 戴华. HPLC法检测水产品中孔雀石绿、结晶紫及其关联化合物的残留[J]. 海南医学院学报, 2011, 17(9): 1157-1163.
- [20] 桑丽雅, 王振国, 柳爱春. 孔雀石绿胶体金快速检测试剂板的研制及应用[J]. 西北农业学报, 2012, 21(6): 186-191.
- [21] 李晓丽, 陈雪岚, 刘春梅, 等. 孔雀石绿单克隆抗体的制备及直接竞争ELISA方法的建立[J]. 食品科学, 2009, 30(24): 283-286.
- [22] LAI Weihua, XU Yang, DENIEL Y C F, et al. Development of a lateral-flow assay for rapid screening of the performance-enhancing sympathomimetic drug clenbuterol used in animal production[J]. Asia Pac J Clin Nutr, 2007, 16(Suppl 1): 106-110.
- [23] 鲍蕾, 梁成珠, 吕宁, 等. 免疫层析法快速定量检测植物油中黄曲霉毒素[J]. 农产品加工, 2013(1): 73-75.
- [24] 王海彬. 花生中黄曲霉毒素免疫层析快速定量技术研究[D]. 北京: 中国农业科学院, 2012.