

# 胶体金免疫层析技术测定食品中黄原胶

夏敏<sup>1</sup>, 杜美红<sup>1</sup>, 贾瑜<sup>2</sup>, 赵建业<sup>1</sup>, 陈舜琮<sup>1</sup>, 张德红<sup>2</sup>, 赵正苗<sup>2</sup>

(1.北京市理化分析测试中心, 北京 100089; 2.北京勤邦生物技术有限公司, 北京 102206)

**摘要:** 目的: 建立一种简便实用的胶体金免疫层析检测新方法, 用于食品中黄原胶的快速筛查。方法: 用黄原胶抗原标准品免疫新西兰大白兔, 制备得到高效价的抗黄原胶多克隆抗体; 采用柠檬酸三钠还原法制备胶体金, 并将其与抗黄原胶多克隆抗体标记制成金标抗体; 在硝酸纤维素膜检测线上, 预包被黄原胶标准抗原, 质控线上包被羊抗兔IgG, 采用竞争法, 制成黄原胶胶体金免疫层析检测试纸条, 并对试纸条的特异性、敏感性和稳定性进行了试验。结果: 该试纸条检测样品的敏感性为3g/kg。结论: 研制出黄原胶胶体金免疫层析试纸条及其检测方法, 该方法敏感性高、特异性强、操作简便, 5min可出检测结果, 可用于现场大量样品的快速检测。

**关键词:** 黄原胶; 胶体金免疫层析; 快速检测

## Detection of Xanthan Gum in Foods by Colloid-Gold Immunochromatographic Assay

XIA Min<sup>1</sup>, DU Mei-hong<sup>1</sup>, JIA Yu<sup>2</sup>, ZHAO Jian-ye<sup>1</sup>, CHEN Shun-cong<sup>1</sup>, ZHANG De-hong<sup>2</sup>, ZHAO Zheng-miao<sup>2</sup>

(1. Beijing Center for Physical and Chemical Analysis, Beijing 100089, China;

2. Beijing Kwinbon Biotechnology Co. Ltd., Beijing 102206, China)

**Abstract:** Objective: To develop a new rapid colloid-gold immunochromatographic assay for the screening of xanthan gum in foods. Methods: The immunochromatographic assay was based on competitive immunoassay. Standard xanthan gum was used to immunize New Zealand rabbits to obtain high titer polyclonal antibodies. Colloid-gold was prepared according to the sodium citrate method, and was then conjugated to polyclonal antibodies. Xanthan gum antigen was coated on nitrocellulose membrane and goat anti-rabbit IgG was coated on control line. Results: The developed colloid-gold immunochromatographic assay revealed a detection sensitivity of 3 g/kg. Conclusion: A new colloid-gold immunochromatographic strip for the detection of xanthan gum has been successfully developed. This method is highly specific, sensitive, rapid (the detection procedure can be completed in 5 min) and suitable for in situ, rapid, large-scale detection.

**Key words:** xanthan gum; colloid-gold immunochromatography; rapid screening

中图分类号: TS207.3

文献标识码: A

文章编号: 1002-6630(2012)20-0270-04

食品安全问题始终是广大消费者关心的热点问题, 人工合成食品添加剂的过量使用直接影响食品的安全性。黄原胶是一种胞外多糖, 在国内外广泛运用于各行业。作为食品添加剂, 其具有良好的稳定性和增稠性, 但GB 2760—2011《食品安全国家标准: 食品添加剂使用标准》对其的最大使用量有规定, 且食品整治办也将其列入易滥用的食品添加剂的名单中<sup>[1]</sup>。对于黄原胶含量的检测, 目前还没有一套行之有效的方法, 所以对黄原胶检测方法的研究是食品安全监管的重要环节。胶体金免疫层析技术操作简便、成本低、结果准确并易于判读, 已广泛应用于多种病原菌和农药残留等的检测<sup>[2-5]</sup>。

本研究利用自制的黄原胶抗原的多克隆抗体, 以胶体金标记后, 采用竞争胶体金免疫层析法制备黄原胶胶体金免疫层析试纸条, 旨在高灵敏、低成本并用于现场

快速检测和筛查工作。

## 1 材料与方 法

### 1.1 材料与试剂

黄原胶标准品 日本TCI公司; 氯金酸、柠檬酸三钠、磷酸、碳酸钾 北京化学试剂公司; 弗氏佐剂(羊毛脂、液体石蜡, 自配)、弗氏不完全佐剂(羊毛脂、液体石蜡和卡介苗, 自配) 国药集团化学试剂北京有限公司; 牛血清白蛋白(BSA)、卵清蛋白(OVA) 美国Sigma公司; 羊抗兔IgG 北京吉比埃生物技术有限公司; 商品化蛋白保护剂 北京索来宝公司; 硝酸纤维素膜、样品垫、吸水垫 上海良信科技有限公司; 多糖胶、卡拉胶、明胶 商务部流通产业促进中心实验室。

收稿日期: 2011-09-15

基金项目: 北京市科学院科技创新工程项目(PXM2011\_178305\_113116)

作者简介: 夏敏(1956—), 女, 研究员, 硕士, 主要从事食品及药物分析方法研究。E-mail: xiamin91@yahoo.com.cn

## 1.2 仪器与设备

UVmini-1240紫外-可见分光光度计 日本岛津公司; Biodot点膜仪 长沙博优生化制品有限公司; 90-2型恒温电磁搅拌器 上海振荣科学仪器有限公司; DH-101-2型电热恒温培养箱 上海一恒科技有限公司; S4800冷场发射扫描电子显微镜 日本日立公司。

## 1.3 方法

### 1.3.1 黄原胶多克隆抗体的制备

#### 1.3.1.1 动物免疫

将黄原胶溶液用0.02mol/L磷酸缓冲液(PBS)稀释成质量浓度为1.0mg/mL的溶液,用于免疫新西兰大白兔2只。首次免疫时,将上述溶液与等量的弗氏佐剂混匀,每只兔子注射2.0mL,在颈背部皮下多点注射,每点0.2mL,第2次免疫时将上述溶液与等量的弗氏不完全佐剂混匀,每只兔子用2.0mL,在颈背部皮下多点注射,每点0.2mL。每次注射间隔2周,免疫期间采血,检测抗血清效价,连续加强免疫,直到抗体效价大于1:10000( $OD_{450nm} > 1.5$ )为止。最后一次用无佐剂抗原1.0mg腹腔注射。

#### 1.3.1.2 动物采血

检测效价时可用注射器针头刺破耳缘静脉采血,免疫完毕后大量血清的采集可以将兔子全身麻醉后实施心脏穿刺取血。

#### 1.3.1.3 分离血清

将采得的血液于37℃放置1h,再转入4℃过夜,待血块充分收缩后迅速分离血清,并于4℃、2500r/min离心血块20min,收集上清液与前面的血清混合,再于4℃、1500r/min离心全部血清,收集上清液,分装,将一部分上清液于-20℃冻存,另一部分上清液于4℃保存备用。

#### 1.3.1.4 抗血清纯化

采用辛酸-硫酸铵法<sup>[6-7]</sup>纯化制得的多克隆抗体,以PBS液作空白对照,用紫外-可见分光光度计在280、260nm测定其吸光度,计算蛋白含量<sup>[8]</sup>。

### 1.3.2 胶体金标记抗体的制备

#### 1.3.2.1 胶体金的制备

采用柠檬酸三钠还原法<sup>[9]</sup>制备胶体金,具体操作如下:取0.01%氯金酸溶液100mL,用恒温电磁搅拌器加热至沸腾,在持续搅拌的情况下加入1%柠檬酸三钠溶液2.5mL,继续搅拌加热20min,溶液呈透亮的红色。冷却至室温,用去离子水定容至100mL,于4℃保存。

#### 1.3.2.2 胶体金质量鉴定

肉眼观察:用肉眼观察制备的胶体金的颜色、均匀度、有无杂质、透明度情况;紫外-可见光谱分析:取冷却后的胶体金溶液,用紫外-可见分光光度计在200~600nm进行扫描,确定最大吸收峰波长,观察最大吸收峰的峰形、峰宽;电镜观察:取冷却后的胶体金溶液,通过电镜观察胶体金颗粒直径的大小。

### 1.3.3 黄原胶多克隆抗体-胶体金标记物的制备

复溶缓冲液:在0.02mol/L、pH9.0的硼酸溶液中,加入0.1%卵清蛋白、0.05%表面活性剂和0.3%蛋白保护剂。

在磁力搅拌下,用0.1mol/L碳酸钾溶液将胶体金的pH值调至7.0,按每毫升胶体金溶液中加入抗体100 $\mu$ g的标准向50mL胶体金溶液中加入黄原胶多克隆抗体5mg,搅拌混匀30min,加入10g/100mL BSA,使BSA在胶体金溶液中的最终质量浓度为1g/100mL,静置30min。12000r/min、4℃离心30min,弃去上清液,沉淀物用复溶缓冲液洗涤两次,用体积为初始胶体金体积1/20的复溶缓冲液将沉淀重悬,置4℃备用。

#### 1.3.4 胶体金免疫试纸条的制备

##### 1.3.4.1 冻干金标抗体的制备

将制备好的黄原胶多克隆抗体-胶体金标记物加入微孔条中,每孔加50 $\mu$ L,盖上酶标板盖,放入冻干机中冻干20h后取出,此时观察微孔条中的金标抗体呈固体状态结合在孔底。将制备好的金标抗体加入干燥剂,置4℃备用。

##### 1.3.4.2 样品吸收垫的准备

将样品吸收垫置于0.1mol/L碳酸盐缓冲液(含0.4%鼠血清白蛋白、pH9.9)中浸泡2h,在37℃烘30min备用。

##### 1.3.4.3 硝酸纤维素膜的处理与包被

用包被液将黄原胶标准品稀释,用Biodot点膜仪将其包被于硝酸纤维素膜上的检测线位置,确定包被量;用0.01mol/L、pH7.4的PBS稀释羊抗兔IgG抗体,用Biodot点膜仪将其包被于硝酸纤维素膜上的质控线位置,确定包被量。

## 2 结果与分析

### 2.1 黄原胶多克隆抗体制备结果

对新西兰大白兔经过7次免疫,静脉采血后用直接ELISA方法进行检测,测得抗血清的效价为1:20000( $OD_{450nm} > 1.5$ );大量采血分离血清纯化后,经紫外-可见分光光度计测得抗体的质量浓度为18.27mg/mL。

### 2.2 制得胶体金的颗粒特征



图1 胶体金溶液的透射电镜观察图像

Fig.1 Transmission electron microscopic image of colloidal gold

通过采用柠檬酸三钠还原法制备获得胶体金颗粒。

用肉眼观察制备的胶体金,其颜色为酒红色,无杂质、透明度较高。将冷却后的胶体金溶液在200~600nm扫描,其最大吸收峰的峰宽较小,说明胶体金颗粒分布比较均匀。用透射电镜观察粒径均匀,约40nm,形状规则。详见图1。

### 2.3 胶体金标记结果

制得的黄原胶多克隆抗体-胶体金标记物离心后无挂壁及沉淀现象,重悬后溶液澄清,可以用于后续实验。

### 2.4 胶体免疫层析试纸条的制备结果

用包被液将黄原胶标准品稀释5倍后,用Biodot点膜仪将其包被于硝酸纤维素膜上,作为检测线(T线),包被浓度为1mg/mL;在距离检测线4mm处,用Biodot点膜仪将PBS液(0.01mol/L、pH7.4)稀释10倍后的羊抗兔IgG抗体喷上,即为质控线(C线),包被质量浓度为1mg/mL。

### 2.5 胶体金免疫试纸条各种技术参数的确定

#### 2.5.1 胶体金试纸条敏感性的确定

用黄原胶标准品分别配制质量浓度为0、10、20、30、40mg/L的系列,用制备好的试纸条进行检测,每个浓度重复测定10次。经试验该试纸条对黄原胶标准溶液的敏感性为30mg/L。结果见表1。

表1 胶体金试纸条测定黄原胶标准溶液结果

Table 1 Results of detection of xanthan gum standard solution by colloidal gold immunochromatographic strip

黄原胶溶液质量浓度/(mg/L)	检测结果
0	质控(C)线和检测(T)线均显色,全为阴性
10	质控(C)线和检测(T)线均显色,全为阴性
20	质控(C)线和检测(T)线均显色,全为阴性
30	质控(C)线显色,但检测(T)线不显色,全为阳性
50	质控(C)线显色,但检测(T)线不显色,全为阳性

#### 2.5.2 样品前处理方法的确定

将固体样品碾碎后,称取1g(液体样品可以直接取样),溶于20mL蒸馏水中,放入恒温水浴锅中,在60~70℃的温度下浸泡30min,其中每隔10min,振荡一次,使其充分溶解后冷却备用。

将处理好的样本与稀释液按1:4的比例混匀后,取100μL加入微孔中,插入试纸条进行检测。经验证,此方法处理后的样本检测结果准确。

#### 2.5.3 胶体金试纸条的检出限

取挂面、红糖、糕点等样品共10份,在上述样品中分别添加1、2、3、4、5g/kg黄原胶标准品,用试纸条进行检测,结果表明对样品中黄原胶的检出限为3g/kg。

#### 2.5.4 试纸条稳定性实验

取三批胶体金试纸条,分别置于4、37℃和18~25℃条件保存,每7d测定一次,分别检测黄原胶标准溶液(30mg/L)以及添加了黄原胶标准品(3g/kg)的阳性挂面和未添加黄原胶的阴性挂面(含量小于3g/kg)样本各5份,每

个质量浓度重复测定3次,结果见表2。由表2结果可知,胶体金试纸条性能稳定。

表2 胶体金试纸条的稳定性实验

Table 2 Stability of colloidal gold immunochromatographic strip

保存温度/℃	时间/d	黄原胶标准溶液(30mg/L, n=5)	挂面-1(黄原胶含量小于3g/kg, n=5)	挂面-2(黄原胶含量为3g/kg, n=5)
4	0	+	—	+
	7	+	—	+
	14	+	—	+
	21	+	—	+
37	0	+	—	+
	7	+	—	+
	14	+	—	+
	21	+	—	+
18~25	0	+	—	+
	7	+	—	+
	14	+	—	+
	21	+	—	+

#### 2.5.5 特异性检测结果

将其他相关的添加剂如卡拉胶、多糖胶、明胶按照样本前处理的方法进行处理后,配成3mg/L溶液,用胶体金试纸条检测,进行特异性试验。结果表明,胶体金试纸条与卡拉胶、多糖胶和明胶没有交叉反应,可以进行黄原胶的定性检测,特异性强。

## 3 讨论

自从应用胶体金竞争免疫层析法检测牛奶中的孕酮以来<sup>[10]</sup>,胶体金免疫层析法就以其灵敏度高、成本低、操作简便、检测快速等优势,被越来越多地应用到食品安全快速检测的研究中,特别是食品中兽药残留的检测<sup>[11-15]</sup>。黄原胶作为一种食品添加剂,目前还没有较好的检测方法。本研究以现场快速检测、降低检测成本为出发点,采用免疫胶体金层析法研制出食品添加剂黄原胶的快速检测试纸条,填补了这一空缺,具有很强的实际应用价值。

目前,国内外对黄原胶的研究多集中于发酵生产、理化特性等方面,而对其免疫和生物学性能及检测方法的研究报道甚少。黄原胶是五聚糖的重复多聚体,分子质量较大,用其直接做抗原进行免疫。经3次免疫后,ELISA检测抗血清就呈现阳性,但其对标准品出现抑制的质量浓度较高,大于50μg/mL,不利于其后续试纸条的方法开发,故本研究对实验动物进行多次加强免疫,使

抗血清对黄原胶标准品抑制的浓度逐渐降低,直至9次免疫后所采血清才达到达到后续实验的要求。与常规蛋白类免疫原相比,其免疫周期较长,这可能与黄原胶能提高免疫活性有关<sup>[16]</sup>。

在研制胶体金试纸条的过程中,胶体金的制备是关键。柠檬酸钠还原法制备胶体金颗粒已经成为了一种普遍的方法,但是在制备过程中必须注意所用试剂和耗材的质量和洁净度,以及严格把握胶体金粒径的大小,才能够保证试纸条的质量。本实验制备的胶体金颗粒直径为40nm,粒径均匀,形状规则,保证了试纸条检测结果的准确性。

基于黄原胶抗体开发生物检测方法,国内已有ELISA方法的报道<sup>[17]</sup>,但基于胶体金试纸条的研究还未出现。由于对黄原胶检测只是针对其是否超标,故开发定性检测试纸条更具有实际意义。GB 2760—2011《食品安全国家标准:食品添加剂使用标准》中,生干面制品中黄原胶的最大使用量为4g/kg,其他食品中黄原胶的最大使用量都高于4g/kg。而本研究制备的试纸条对黄原胶的检出限为3g/kg,低于国标规定限量,可确保检测样本是否超标。

#### 4 结 论

本研究用黄原胶标准品免疫新西兰大白兔获得了针对黄原胶的多克隆抗血清,并以此为原材料研制出检测黄原胶的快速检测试纸条。此试纸条检出限为3g/kg,检测时间只需5min,适用于对生干、湿面制品、糖和糖浆、酸奶、饮料等样品的快速检测,能够初步满足食品添加剂黄原胶的快速筛查。

#### 参考文献:

[1] 食品整治办(2008)3号《食品中可能违法添加的非食用物质和易滥用的食品添加剂品种名单(第一批)》的通知[B].

- [2] 姜艳彬,孙冠如,王海,等. 盐酸克伦特罗胶体金快速检测试纸条的研制[J]. 中国畜牧兽医, 2010, 37(10): 109-113.
- [3] 孙洋,冯书章,郭学军,等. 肠出血性大肠杆菌O157胶体金免疫层析试纸条的研制[J]. 中国人兽共患病学报, 2008, 24(4): 356-359.
- [4] 赵海锋,甘一如. 胶体金免疫层析法检测小分子物质[J]. 农药, 2007, 46(7): 439-446.
- [5] 崔焕忠,张辉,王兴龙. 胶体金试纸快速检测食品中单增李斯特菌[J]. 食品科学, 2010, 31(4): 239-242.
- [6] LAMBERT L A, WAMER W G, WEI R R, et al. The protective but nonsynergistic effect of dietary  $\beta$ -carotene and vitamin E on skin tumorigenesis in skh mice[J]. Nutrition and Cancer, 1994, 21(1): 15-18.
- [7] 刘晓波,蔡美英,王霞,等. 一种简单实用纯化腹水McAb方法: 辛酸-硫酸铵法[J]. 华西医科大学报, 1999, 30(4): 455-456.
- [8] 杨利国,胡少昶,魏平华,等. 酶免疫测定技术[M]. 南京: 南京大学出版社, 1998: 272-273.
- [9] SUN Xiulian, ZHAO Xiaolian, TANG Jian, et al. Preparation of gold-labeled antibody probe and its use in immunochromatography assay for detection of aflatoxin B<sub>1</sub>[J]. International Journal of Food Microbiology, 2005, 99(2): 185-194.
- [10] MIKA P A, LAITINEN M P, VUENTO M. Affinity immunosensor for milk progesterone: identification of critical parameter[J]. Biosensors and Bioelectronics, 1996, 11(12): 1207-1214.
- [11] 张改平,职爱民,邓瑞广,等. 兽药残留的免疫学快速检测技术概述[J]. 河北农业科学, 2009(9): 193-195.
- [12] 王钱,李康,陈树芬,等. 胶体金免疫层析法对组织样品中磺胺甲噁唑残留的快速检测[J]. 分析测试学报, 2009, 28(4): 458-461.
- [13] 张慧嫦,张少恩,吴忠华,等. 胶体金免疫层析法快速检测盐酸克伦特罗残留[J]. 中国国境卫生检疫杂志, 2008, 31(1): 39-42.
- [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基嘧啶残留[J]. 食品科学, 2010, 31(24): 366-369.
- [15] 向军俭,王五洲,唐勇,等. 胶体金免疫层析法检测食用肉中的氨基胍[J]. 中国国境卫生检疫杂志, 2008, 31(1): 39-42.
- [16] 李信,许雷,刘四朝. 黄原胶免疫活性的初步研究[J]. 中国兽医科技, 1998, 28(12): 41-43.
- [17] 秦红梅,黄蕊,郑剑玲,等. 间接竞争酶联免疫吸附法测定黄原胶[J]. 中国食品卫生杂志, 2008, 20(3): 241-244.