盐酸克伦特罗与莱克多巴胺联检速测卡的研制

罗奕铭
（广州瑞森生物科技有限公司，广东广州 511400）

摘要：本文研究建立了一种检测盐酸克伦特罗与莱克多巴胺联检速测卡的方法。应用胶体金免疫层析技术，采用柠檬酸钠还原法制备胶体金颗粒，标记盐酸克伦特罗与莱克多巴胺单克隆抗体并喷于玻璃纤维上，盐酸克伦特罗与莱克多巴胺偶联 OVA 抗原和羊抗鼠 IgG 分别结合于硝酸纤维膜上，依次将样品垫、胶体金垫、硝酸纤维素膜和吸水纸组装切割成盐酸克伦特罗与莱克多巴胺联检速测卡。试验结果表明，该联检速测卡的灵敏度分别为 CLEN 3 ng/mL、RAC 5 ng/mL，检测时间为 3 min，批内和批间重复性为 100%，假阳性率和假阴性率均为 0。

关键词：盐酸克伦特罗；莱克多巴胺；胶体金免疫层析；联检速测卡

文章篇号：1673-9078(2013)1-197-200

Research of Synchronizating Rapid Detection with Clenbuterol and Ractopamine

LUO Yi-ming
(Guangzhou Ruisen Biotechnology Co., Ltd, Guangzhou 511400, China)

Abstract: This study established a method of synchronizating rapid detection with clenbuterol and ractopamine by using colloidal gold immunochromatography and sodium citrate reduction for preparation of colloidal gold particles. To mark clenbuterol and ractopamine monoclonal antibody, and sprayed on glass fiber, the antigen of clenbuterol and ractopamine coupled OVA and sheep anti-mouse IgG were combined with nitrocellulose membrane respectively. Then, the sample pad, colloidal gold pad, nitrocellulose membrane and absorbent paper were assembled and cut into Articles. The results showed that sensitivity of the rapid detection article was 3 ng/mL for CLEN and 5 ng/mL for RAC .The detection time was 3 min and intra-and inter-reproducibility was 100% . False positive rate and false negative rates were 0.

Key words: clenbuterol; ractopamine; colloidal gold immunochromatography; rapid detection card

进入 21 世纪以来，食品安全问题受到越来越多人的重视，我国多起瘦肉精中毒事件的频繁发生，引起社会对食品安全监管的强烈不满。瘦肉精是一种 β_2 受体激动剂，主要包括克伦特罗(Clenbuterol, CLEN)，莱克多巴胺（ractopamine, RAC）。有研究表明[1,2]，CLEN 和 RAC 可有效地提高动物的产肉性能和饲料报酬。但是，当 CLEN 使用剂量达治疗量 5~10 倍时，对人与动物的肝、肾等内脏器官有毒副作用，严重时会引起死亡[3]，对人类健康有着很大的危害，被禁止在畜产品生产中使用[4]。因此农业部明确规定，克伦特罗、莱克多巴胺等一类 β_2 受体激动剂被禁止作为饲料添加剂使用[5]。

20 世纪 80 年代兴起的胶体金免疫层析检测技术(gold immu-nochromagraphy assay, GICA)，操作简单快捷、结果清晰易于判断、无需复杂的实验技能和特殊设备。其原理是基于抗原与抗体之间的特异性反应。在硝酸纤维素膜上预先固定好特异性抗原(或抗体)和抗体作为 2 种捕获剂，分别设定为检测线(T 线)和质控线(C 线)[6]。反应物是固定于胶体金结合垫上并标记了待测物抗原(或抗体)的胶体金颗粒。将样品液滴加在试纸条的样品垫上,样品液先溶解固定在胶体金结合垫上的胶体金，并与样品液中的待测物抗体形成复合物。当溶液在毛细管作用下到达 T 线时，T 线上的抗原与待测物抗体-胶体金复合物再次发生特异性结合从而使桥连胶体金被截留在 T 线上聚集并显示出颜色[7,8]。因此,可以根据试纸条 T 线的颜色深浅或有无来判断样品中是否含有待测物。该方法是进行定性或半定量检测的一种有效途径[9~11]。

本研究建立一种快速、有效、高灵敏度盐酸克伦特罗与莱克多巴胺联检速测卡，试验根据胶体金免疫层析原理，实现特异性免疫检测。

1 材料和方法

1.1 材料与设备

收稿日期：2012-08-27

作者简介：罗奕铭（1985-），男，研究生，硕士，食品质量与安全

牛血清白蛋白（BSA），天津正将高科公司；聚乙二醇（PEG）、三羟甲基氨基甲烷（Tris），北京鼎国生物；柠檬酸三钠、碳酸氢钠、碳酸钾、碳酸钠、叠氮钠、磷酸氢二钠、磷酸二氢钠、吐温-20、盐酸，广州化学试剂厂；氯金酸，上海国药；羊抗鼠抗体，武汉博士德；鼠抗盐酸克伦特罗单抗、鼠抗莱克多巴胺单抗、CL-BSA、RAC-BSA，瑞森生物；硝酸纤维素膜（Sartorius）；聚酯膜、玻璃纤维（Pall)；吸水纸、磁白板（上海金标）；塑料卡、铝箔袋，广州。

三维划膜喷金仪 HM3030、金标试纸分切机 WM-100（上海金标）；连续点膜机 R5DD-2（韩感）；磁力搅拌器（国产）。

1.2 试验方法

1.2.1 胶体金溶液的制备

量取 40 mL 纯水于洁净的圆底烧杯，用磁力搅拌器加入至沸腾，加入 0.04 mL 10%氯金酸溶液沸腾 5 min 后加入 0.096 mL 10%柠檬酸三钠溶液，保持沸腾 10 min。待溶液温度降至室温后装入棕色密封容量瓶中，避光保存。

1.2.2 金标记盐酸克伦特罗（莱克多巴胺）抗体的制备

量取 20 mL 胶体金溶液，倒入洁净离心管内，用 0.1 M 碳酸钾溶液和 0.1 M 盐酸溶液调胶体金溶液 pH 值至 8.2。再称取 0.144 mg 的盐酸克伦特罗（莱克多巴胺）单抗加入到胶体金溶液内，振荡混匀，室温放置 20 min 后加入 0.02 mL 10% BSA 溶液，振荡混匀，室温放置 20 min 后，把金标记的抗体溶液分装到离心管内，11000 r/min 离心 15 min。吸取上清液。再加入 10 mL 0.1M 磷酸盐缓冲液将沉淀混匀，于 11000 r/min 离心 15 min，吸取上清液后加入 4 mL 金标缓冲液将沉淀混匀，得到金标记盐酸克伦特罗（莱克多巴胺）抗体溶液。

1.2.3 金标抗体结合垫的制备

量取 0.39 mL 金标盐酸克伦特罗抗体溶液和 0.39 mL 金标莱克多巴胺抗体溶液按一定比例一起倒入洁净小离心管内。设定喷金仪主机程序：喷金浓度为 20 μL/cm，平台移动速度为 128 mm/s，再将玻璃纤维膜放置于喷金仪平台，按设定程序将金标抗体均匀喷洒于玻璃纤维膜上。将喷好的金标抗体结合垫放置于真空干燥箱内室温抽干 6 h 后，再放于有干燥剂的自封袋中保存备用。

1.2.4 划膜

称取 0.468 mg CL-BSA 和 0.78 mg RAC-BSA 原液分别于洁净离心管内，加入划膜缓冲液稀释至终浓度为 1 mg/mL，称取 1.56 mg 羊抗鼠二抗溶液于另一离心管内，加入划膜缓冲液稀释终浓度为 2 mg/mL。将硝酸纤维素膜放置于划膜仪平台，两端用压条固定，设定划膜仪主机程序：划膜浓度为 2 μL/cm，平台移动速度为 128 mm/s。按设定程序将盐酸 CL-BSA、RAC-BSA 按一定比例混合后和二抗划于硝酸纤维素膜上后置于真空干燥箱内室温抽干 6 h，干燥后封袋保存备用。使 CL-BSA 所划线标记为检测线 T1，RAC-BSA 所划线标记为检测线 T2，羊抗鼠二抗所划线标记为质控线 C。

1.2.5 胶体金免疫层析联检速测卡组装

将样品垫、胶体金垫、已包被好抗原抗体的NC膜、吸水纸依次粘贴到PVC底板上，切割成条，装卡封口密封，置于干燥器中常温保存备用。

1.2.6 样品制备

1.2.6.1 阴性样品的制备

经GC-MS法（农业部1031号公告-3-2008中的“猪肝和猪尿中β-受体激动剂残留检测-气相色谱-质谱法”）检测克伦特罗、莱克多巴胺阴性的80份尿液。

1.2.6.2 克伦特罗（莱克多巴胺）添加阳性样品的制备

（1）1、3、5 μg/L：取100 μg/L克伦特罗工作液10、30、50 μL于990、970、950 μL阴性猪尿中混匀，按此方法制备各10个样品。

（2）3、5、8 μg/L：取100 μg/L莱克多巴胺工作液30、50、80 μL于970、950、920 μL阴性猪尿中混匀，按此方法制备各10个样品。

1.2.6.3 实测阳性样品的准备

10 份经 GC-MS 检测克伦特罗为阳性的实际猪尿样品（浓度均大于 3 μg/L）。10 份经 GC-MS 检测莱克多巴胺为阳性的实际猪尿样品（浓度均大于 5 μg/L）。

1.2.7 灵敏度

取 3 批次克伦特罗与莱克多巴胺联检速测卡分别检测添加克伦特罗浓度为 0 μg/L、1 μg/L、3 μg/L、5 μg/L的猪尿样；添加莱克多巴胺浓度为 0 μg/L、3 μg/L、5 μg/L、8 μg/L 的猪尿样各 10 份。室温条件下操作，肉眼观测进行判定。

1.2.8 假阳性率试验

克伦特罗与莱克多巴胺联检速测卡对 80 份经 GC-MS 检测为阴性的猪尿进行检测，并分别以含克伦特罗为 0 和 3 μg/L 的猪尿；莱克多巴胺为 0 和 5 μg/L 的猪尿为阴性对照和阳性对照，计算假阳性率。

1.2.9 假阴性率试验

克伦特罗与莱克多巴胺联检速测卡对 40 份阳性猪尿（10 份为 3 μg/L 克伦特罗阳性添加样品，10 份为 5 μg/L 莱克多巴胺阳性添加样品，10 份为浓度均大

于 3 μg/L 实测克伦特罗阳性样品，10 份为浓度均大于 5 μg/L 实测莱克多巴胺阳性样品）进行检测，并分别以含克伦特罗 0 和 3 μg/L 尿样；莱克多巴胺 0 和 5 μg/L 尿样为阴性对照和阳性对照，计算假阴性率。

1.2.10 联检速测卡的批内和批间重复

将同批和不同批次的联检速测卡分别检测上述阴性样品、阳性样品、实测阳性样品，每个浓度重复 10 次，观察其重复性。

2 结果与讨论

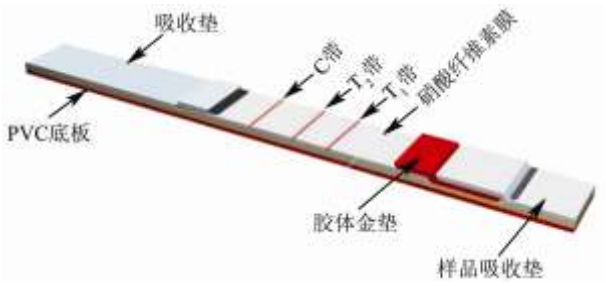


图 1 试纸条结构示意图

Fig.1 The structure diagram of rapid detection article

胶体金免疫试纸条的作用原理主要有双抗夹心和竞争结合两种。本试验研制的克伦特罗与莱克多巴胺联检速测卡采用了竞争原理，如图 1 所示拆开卡壳的试纸条，底板为 PVC 底板（双面胶白色塑料板），从加样处开始分别为样品吸收垫、胶体金垫(玻璃纤维)、硝酸纤维素膜（NC 膜)和吸水垫。胶体金垫上喷涂胶体金标记的 CLEN 和 RAC 单克隆抗体，NC 膜上分别喷涂偶联抗原 CLEN-BSA（检测线 T_1）和 RAC-BSA （检测线 T_2）和羊抗鼠 IgG（质控线 C）。该法检测线 T_1、T_2 出现红色条带，结果显示为 CLEN 和 RAC 阴性；检测线无条带，结果显示为 CLEN 和 RAC 阳性；检测线 T_1 出现红色条带 T_2 无条带，结果显示为 CLEN 阴性 RAC 阳性；检测线 T_1 无条带 T_2 出现红色条带，结果显示为 CLEN 阳性 RAC 阴性。这是因为当被检物质溶液中不含 CLEN 或 RAC 时，玻璃纤维上释放的胶体金标记 CLEN 和 RAC 单克隆抗体便会被检测线处的偶联抗原 CLEN-BSA 或 RAC-BSA 物质识别并结合，因而被截留在该处，当累积到一定程度便出现红色线，但弱阳性时会出现反应强度减弱的检测线； 当被检物质溶液中 CLEN 或 RAC 的浓度达到一定时，CLEN 或 RAC 与胶体金标记的全部 CLEN 或 RAC 抗体的反应位点结合，这样当免疫胶体金到达检测线时不能再与偶联抗原发生反应，因而不出现红色线。无论被检测物质中有无 CLEN 或 RAC，胶体金标记的 CLEN 或 RAC 单克隆抗体都会与喷涂在 NC 膜上的羊抗鼠 IgG 发生免疫反应，即在质控区出现红色线。

2.1 灵敏度



图 2 梯度浓度显色结果

Fig.2 The results of color gradient concentration

试验结果如图 2 所示，三个批号各梯度浓度的检测卡在 3 min 内结果呈梯度变化，CLEN 3 μg/L、RAC 5μg/L 的添加样品质控带显色，检测带无明显显色；CLEN 8 μg/L、RAC 8 μg/L 的添加样品质控带显色，检测带无显色；0 μg/L CLEN 和 RAC 样品质控带和检测带均显色。表明胶体金免疫层析试验具有良好的敏感性和特异性，故该胶体金检测试纸卡的检测限可定为 CLEN 3 μg/L、RAC 5 μg/L。

2.2 假阳性率试验

对 80 份经 GC-MS 法检测为阴性的猪尿进行检测，以该方法检测限 CLEN 3 μg/L、RAC 5 μg/L 为判定限进行判断，80 份尿样均为阴性，该 80 份样品的假阳性率为 0，见表 1

表 1 猪尿阴性样本检测结果

Table 2 The test results of pig urine negative sample

样品	测定结果									
空白猪尿	阴性	阴性	阴性	阴性	阴性	阴性	阴性	阴性	阴性	阴性
	阴性	阴性	阴性	阴性	阴性	阴性	阴性	阴性	阴性	阴性
	阴性	阴性	阴性	阴性	阴性	阴性	阴性	阴性	阴性	阴性
	阴性	阴性	阴性	阴性	阴性	阴性	阴性	阴性	阴性	阴性
	阴性	阴性	阴性	阴性	阴性	阴性	阴性	阴性	阴性	阴性
	阴性	阴性	阴性	阴性	阴性	阴性	阴性	阴性	阴性	阴性
	阴性	阴性	阴性	阴性	阴性	阴性	阴性	阴性	阴性	阴性
	阴性	阴性	阴性	阴性	阴性	阴性	阴性	阴性	阴性	阴性

2.3 假阴性率试验

联检速测卡对 40 份阳性猪尿进行检测，以该方法检测限 CLEN 3 μg/L、RAC 5 μg/L 为判定限进行判断，40 份尿样均为阳性，该 40 份样品的假阴性率为 0，见表 2。

表 2 猪尿阳性样本检测结果

Table 2 The test results of pig urine positive sample

样品	方法	测定结果									
CLEN 阳性	检测卡（10 份）	阳性	阳性	阳性	阳性	阳性	阳性	阳性	阳性	阳性	阳性
添加样品	添加浓度/(μg/L)	3	3	3	3	3	3	3	3	3	3
RAC 阳性	检测卡（10 份）	阳性	阳性	阳性	阳性	阳性	阳性	阳性	阳性	阳性	阳性
添加样品	添加浓度/(μg/L)	5	5	5	5	5	5	5	5	5	5
实测 CLEN	检测卡（10 份）	阳性	阳性	阳性	阳性	阳性	阳性	阳性	阳性	阳性	阳性
阳性样品	GC-MS 测定/(μg/L)	4.9	5.2	4.3	4.2	5	4.9	4.1	4.2	4.9	5.1
实测 RAC	检测卡（10 份）	阳性	阳性	阳性	阳性	阳性	阳性	阳性	阳性	阳性	阳性
阳性样品	GC-MS 测定/(μg/L)	7.9	9.2	8.3	8.2	9	8.9	8.1	8.2	8.9	9.1

3 结论

本文研究成功建立检测盐酸克伦特罗与莱克多巴胺联检速测卡的方法，联检速测卡的灵敏度分别为 CLEN 3 ng/mL、RAC 5 ng/mL，检测时间为 3 min，批内和批间重复性为 100%，假阳性率和假阴性率均为 0。应用胶体金免疫层析技术，实现一个样本同时检测二种类似的激素，大大降低了检测时间和检测成本，比单检技术更有优势，这方法既简捷又可靠,是一种值得推广的定性筛选方法，可作为液相色谱等仪器法的补充，同时，也作为盐酸克伦特罗、莱克多巴胺快速检测的利器，在我国家禽生产场、动物性食品加工厂、国家和地方的检验/监督部门、食品卫生与安全检验/监察部门等行业领域推广应用，将为我国农药/兽药残留检测和监控计划提供技术支撑，促进我国农业全面发展，提升食品安全和质量等级、提高市场竞争力和增加进出口贸易。

参考文献

[1] Yang Y T, Mc Ell gott M A. Multiple Action ofβ2 Agonists Skeletal and Adipose Tissue [J]. Biochemistry, 1989, 261: 1-10

[2] 王若军,郭年藩.β2肾上腺能受体兴奋剂的的作用机理及运用效果[J].国外畜牧科技,1993,20(6):20-21

[3] Mitchell G A, Dunnavan G. Illegal use of β2adrenergic agonist in the United States [J]. Journal of Animal Science, 1998, 76: 208-211

[4] Kuiper H A, Noordam M Y, Roos A H, et al. Illegal use ofβ2adrenergic agonist: European community [J]. Journal of Animal Science, 1998, 76: 195 - 207

[5] Smith DJ, Ehrenfried K M, Dalidowicz J D, et al. Binding of ractopamine HCl to ocular tissues of cattle and turkeys in vivo and to melanin in vitro [J]. J Anim Sci, 2002b, 80: 2931-2941

[6] Li H, Li JB. Detection of five novelCTX-M-type extended spectrum beta-lactamaseswith one to three CTX-M-14 pointmutations in isolates from Hefe, Anhui province, China [J]. J Clin Microbio, 2005, 43(8): 4301-4302

[7] 程训民,李敏,徐元宏,等.产超广谱β-内酰胺酶大肠杆菌耐药性及基因型检测[J].第三军医大学学报, 2006, 28(16): 1685-1687

[8] 医院消毒卫生标准[S].1995: 268-273

[9] National Committee for Clinical Laboratory Standards Performance standards for antimicrobial susceptibility testing Ninth informational supplemenMt 100-S9 [S]. Wayne:NCCLS, 1999

[10] 郑小银,徐立群.大肠埃希菌超广谱β-内酰胺酶的检测和耐药分析[J].浙江临床医学,2008,10(2):237

[11] 高春明,赵守松,李家斌,等.产CTX-M型超广谱β-内酰胺酶大肠埃希菌分布与耐药性分析[J].实用医学杂志, 2007, 23(11): 1745-1747

欢迎订阅中文核心期刊

《现代食品科技》

邮发代号：46-349 刊号：ISSN 1673-9078/CN 44-1620

地址：广州五山华南理工大学轻工与食品学院麟鸿楼 508，邮编：510640

电话：020-87112373，87114555，87113352，87112532