

盐酸克伦特罗快速检测胶体金试纸的研制

肖治理, 余建华, 雷红涛, 杨金易, 孙远明

(广东省食品质量安全重点实验室, 华南农业大学食品学院, 广东广州 510642)

摘要: 为建立快速检测猪尿等样品中盐酸克伦特罗 (CL) 的胶体金免疫层析方法, 用柠檬酸三钠还原氯金酸制备了胶体金, 将其标记抗 CL 单克隆抗体, 制备了金标抗体; 以 CL-人血清白蛋白 (HSA) 为包被抗原、羊抗鼠 IgG 为质控线二抗, 制成胶体金试纸。优化了胶体金颗粒粒径、标记抗体用量和 pH 值等各项参数, 最终确定胶体金粒径为 15 nm、每毫升胶体金溶液中添加 20 μg 抗体、胶体金溶液 pH 值为 7.4、金标抗体稀释液为添加 0.1% 牛血清白蛋白 (BSA) 的 0.05 mol/L 磷酸盐缓冲液 (pH 7.4)、金标抗体喷涂量为 50 $\mu\text{L}/\text{cm}^2$ 、CL-HSA 和羊抗鼠 IgG 的包被浓度分别 0.5 mg/mL 和 2 mg/mL。研制的 CL 胶体金试纸检测限为 3 ng/mL, 与莱克多巴胺、沙丁胺醇等六种 β -兴奋剂类药物无交叉反应。对 42 份猪尿样品的检测结果与市售酶联免疫 (ELISA) 试剂盒的符合率为 100%。试纸无需仪器辅助, 操作简便, 可在 5 min 内完成, 适用于对 CL 残留进行现场检测。

关键词: 抗原-抗体反应; 金; 胶体; 纳米粒子; 层析; 盐酸克伦特罗 (CL); 试纸

文章编号: 1673-9078(2013)8-2004-2010

Development of a Colloidal Gold Labeled Strip for the Rapid Detection of Clenbuterol

XIAO Zhi-li, YU Jian-hua, LEI Hong-tao, YANG Jin-yi, SUN Yuan-ming

(Key Laboratory of Food Quality and Safety of Guangdong Province, College of Food Science, South China Agricultural University, Guangzhou 510642, China)

Abstract: To develop colloidal gold immunochromatographic technique for the rapid detection of Clenbuterol (CL), colloidal gold was prepared by reduction of HAuCl_4 using trisodium citrate. Anti-CL monoclonal antibodies (MAb) were then labeled with colloidal gold to obtain colloidal gold labeled MAb. The CL-human serum albumin (HSA) and goat anti-mouse IgG were immobilized on the lateral flow membrane to construct the strip. To obtain the best performance of the strip, several conditions were optimized as follows: the diameter of the colloidal gold particle 15 nm, the amount of MAb for labeling 20 $\mu\text{g}/\text{mL}$, the pH value 7.4, the conjugate treating buffer 0.05 mol/L phosphate buffer (pH 7.4) containing 0.1% bovine serum albumin (BSA) and the thickness of colloidal gold-labeled CL antibody in use 50 $\mu\text{L}/\text{cm}^2$. In addition, the antigen and goat anti-mouse IgG were coated at 0.5 mg/mL and 2 mg/mL respectively. Under the optimum conditions, the limit of detection (LOD) of the strip was 3 ng/mL for swine urine. Cross-reaction tests showed that negligible cross-reactivity of the strip with six β -Agonist compounds including ractopamine, salbutamol, etc. was detected. Forty-two samples of swine urine were detected by the developed strip and the results were confirmed by enzyme-linked immunosorbent assay (ELISA) kit. The accordance rate of the two methods was 100%. The determination of CL by the strip did not need any instruments, and the total time for the determination of one sample was only 5 minutes. This method was applicable for the rapid determination of CL in the field.

Key words: antigen-antibody reactions; gold; colloids; nanoparticles; chromatography; clenbuterol (CL); strip

盐酸克伦特罗 (Clenbuterol hydrochloride, CL) 是一种人工合成的 β -肾上腺素兴奋剂, 由于其能加强

收稿日期: 2013-07-11

基金项目: 广东省自然科学基金 (S2012010010323); 广东省食品安全应急检测技术研究中心 (2010A032000001-4); 广东省教育部产学研结合项目 (2011A090200029, 2010A090200084)

作者简介: 肖治理 (1978-), 女, 博士, 讲师, 研究方向为食品安全快速检测技术

通信作者: 孙远明 (1956-), 男, 教授, 研究方向为食品质量与安全

脂肪分解、促进蛋白质合成, 曾被广泛添加在动物饲料中以增加瘦肉率, 俗称“瘦肉精”。人食用了含瘦肉精的肉制品后, 会出现头晕、恶心、手脚颤抖、心跳、肌肉衰弱等症状, 甚至昏迷死亡^[1], 因此瘦肉精已被各国禁止作为生长促进剂使用, 我国农业部早在 2002 年 4 月颁布的第 193 号公告中, 已将其列入“食品动物禁用的兽药及其它化合物清单”。然而在利益驱使下, 其非法使用现象仍然时有发生, 如 2011 年被曝光的“健美猪”事件; 2013 年上半年, 农业部共向社会

通报了8起瘦肉精典型案例;2013年6月,吉林省公安厅通报,自2013年年初以来,吉林省公安机关共查处瘦肉精1万余公斤。

目前,检测CL的方法主要有高效液相色谱法(HPLC)、气相色谱-质谱法(GC-MS)、液相色谱-质谱法(LC-MS)、毛细管区带电泳法(CE)以及免疫分析法(IA)等^[2]。其中免疫分析法以其简便、快速、灵敏、特异、低成本等优点,成为研究的热点,已经报道了检测CL的酶联免疫法(ELISA)^[3]、胶体金免疫层析法(GICA)^[4-5]、时间分辨荧光免疫法^[6]、量子点免疫层析法^[7]、免疫传感器法^[8-9]等,其中以ELISA法和GICA法开发最早、应用最多。基于GICA法原理开发的胶体金试纸操作简便、不需仪器辅助、检测时间短、结果容易判读,在现场检测或样品初筛阶段得到广泛应用。本研究应用自行制备的单克隆抗体,基于竞争法原理,研制了一种快速检测CL的胶体金试纸,并对试纸的各项参数进行了优化,为其他小分子药物胶体金试纸的研制提供参考。

1 材料与方法

1.1 材料与试剂

阳性及阴性猪尿样品由广州市动物防疫监督所提供。CL和沙丁胺醇等 β -兴奋剂标准品、氯金酸、牛血清白蛋白(BSA)、人血清白蛋白(HSA)、羊抗鼠IgG,购自Sigma公司;抗CL单克隆抗体、包被抗原CL-HSA为本实验室自制;CL-ELISA试剂盒购自广州源济林生物技术有限公司。其他试剂均为国产分析纯。

1.2 仪器与设备

5417R高速冷冻离心机,德国Eppendorf公司;U-3010紫外可见光谱仪,日本HITACHI公司;MULTISKAN MK3酶标仪,美国Thermo公司;Tecnai 12透射电子显微镜,荷兰FEI公司。

1.3 方法

1.3.1 胶体金的制备及粒径选择

用去离子水配制100 mL 0.01%氯金酸,过0.22 μm 滤膜后,置于圆底烧瓶中,加热至沸腾;在持续搅拌下迅速加入一定量的1%柠檬酸三钠水溶液,继续搅拌加热至溶液呈透亮的红色。冷却,用去离子水补充至原体积,4 $^{\circ}\text{C}$ 保存。1%柠檬酸三钠水溶液的用量分别采用1.0、1.5、2.0 mL,制备出三种不同粒径的金溶胶。通过肉眼观察、紫外光谱200~800 nm扫

描、透射电镜(TEM)观察进行鉴定。

用三种粒径大小不同的金溶胶分别标记CL抗体,并组装成试纸,用阴性猪尿及CL添加浓度为3、5、10 ng/mL的猪尿测试,选择颜色梯度清晰、与质控线对比明显的粒径进行后续试验。

1.3.2 CL抗体的标记

1.3.2.1 最适抗体用量的选择

将CL抗体溶液用0.1 mol/L pH 7.4的磷酸缓冲液4 $^{\circ}\text{C}$ 透析过夜,12000 r/min于4 $^{\circ}\text{C}$ 离心1 h,去上清后用0.01 mol/L pH 7.4的磷酸缓冲液稀释。用0.1 mol/L K_2CO_3 或HCl调节胶体金溶液的pH值为7.4。分别将含有5、10、15、20、25、30、35、40、45、50 μg 抗体的溶液与1.0 mL胶体金溶液混合,摇匀,静置5 min,然后加入100 μL 10% NaCl,摇匀,静置5 min,3500 r/min于4 $^{\circ}\text{C}$ 离心15 min,测定上清液 $\text{OD}_{520\text{nm}}$ 值。以 $\text{OD}_{520\text{nm}}$ 值为纵坐标,抗体用量为横坐标作图,曲线与横坐标接近平行的转折点所对应的抗体量为稳定胶体金的最低抗体用量。在此基础上增加10%~20%即为稳定胶体金的抗体最适用量^[10]。

1.3.2.2 最适pH值的选择

取8管胶体金溶液,用0.1 mol/L K_2CO_3 或HCl调节pH值分别为:6、6.5、7.4、7.6、8、8.2、9、9.5,在每管胶体金溶液中各加入1.3.2.1确定的最适量抗体,混匀,后续操作同1.3.2.1。选取 $\text{OD}_{520\text{nm}}$ 值最高点对应的pH值为最适pH值。

1.3.2.3 金标抗体的制备、纯化及鉴定

金标抗体的制备方法同1.3.2.1,但以10% BSA代替10% NaCl。离心后取上清液于4 $^{\circ}\text{C}$ 以12500 r/min再次离心30 min。取下层用0.01 mol/L的磷酸缓冲液稀释,4 $^{\circ}\text{C}$ 保存。用紫外光谱仪扫描鉴定。

1.3.3 试纸的制作

采用竞争法原理。将金标抗体稀释后将均匀喷涂于玻璃纤维膜上,真空冷冻干燥。分别将包被抗原CL-HSA及羊抗鼠IgG稀释,划线于硝酸纤维素膜上,作为检测线和质控线,烘干。按常规方法组装试纸^[11],切条,即可用于样品测定。质控线显红色表示检测有效,检测线显红色表示阴性,不显色表示阳性。

1.3.4 试纸检测条件参数的选择

1.3.4.1 金标抗体稀释缓冲液种类的选择

分别配制0.01 mol/L pH为7.4的磷酸盐、硼酸盐、Tris-HCl三种缓冲溶液,用于金标抗体的稀释。按1.3.3的操作制作试纸,金标抗体喷涂量、包被抗原浓度、羊抗鼠IgG包被浓度通过预试验确定,分别为50 $\mu\text{L}/\text{cm}^2$ 、0.5 mg/mL和2 mg/mL。3种试纸分别滴加80 μL 阴性猪尿样测试,5 min后观察显色情况,重复

三次。以检测线颜色最接近质控线的缓冲液为最终选择。

1.3.4.2 金标抗体稀释缓冲液离子浓度的选择

采用 1.3.4.1 确定的缓冲液种类, 分别设置 0.01、0.05、0.1 mol/L 三个不同的离子浓度水平, 配制 pH 为 7.4 的缓冲溶液, 用于金标抗体的稀释。同 1.3.4.1 操作, 以检测线颜色最接近质控线的离子浓度为最终选择。

1.3.4.3 金标抗体稀释缓冲液 pH 值的选择

采用 1.3.4.1、1.3.4.2 确定的缓冲液种类和离子强度, 分别设置三个不同的 pH: 6.4、7.4、8.0, 用于金标抗体的稀释。同 1.3.4.1 操作, 以检测线颜色最接近质控线的 pH 为最终选择。

1.3.4.4 金标抗体稀释缓冲液中 BSA 浓度的选择

采用上述试验确定的缓冲液种类、离子强度、pH 值配制稀释缓冲液, 分别添加 0.1%、0.5%、1% 的 BSA, 同 1.3.4.1 操作。

1.3.4.5 金标抗体喷涂量的选择

金标抗体喷涂量设置 3 个不同处理: 40、50、60 $\mu\text{L}/\text{cm}^2$, 其余操作同 1.3.4.1。制成试纸后, 分别用阴性猪尿样及 CL 添加浓度为 3、5、10 ng/mL 的猪尿样本测试, 选择颜色梯度清晰、与质控线对比明显的喷涂量为最终选择。

1.3.4.6 包被抗原包被浓度的选择

变换包被抗原 CL-HSA 的包被浓度: 0.3、0.5、0.8 mg/mL , 其余操作同 1.3.4.5。选择颜色梯度清晰、与质控线对比明显的包被浓度为最终选择。

1.3.4.7 羊抗鼠 IgG 包被浓度的选择

包被抗原采用 1.3.4.6 确定的浓度包被, 变换羊抗鼠 IgG 二抗的包被浓度: 1.5、2.0、2.5 mg/mL , 其余操作同 1.3.4.5。选择质控线与阴性样品接近、与阳性样品反差较大的浓度为最终选择。

1.3.5 试纸检测限 (LOD) 的确定

按上述试验确定的参数制作试纸, 分别用阴性猪尿及 CL 添加浓度为 3、5、10 ng/mL 的猪尿样本测试, 反应 5 min 后观察, 质控线显色、检测线不显色的最低浓度即为检测限。

1.3.6 试纸交叉反应试验

在阴性猪尿样中分别添加浓度为 50 ng/mL 的系列 β -兴奋剂类药物: 去甲肾上腺素、莱克多巴胺、沙丁胺醇、重酒石酸去甲肾上腺素、硫酸去甲肾上腺素、盐酸肾上腺素及盐酸克伦特罗, 用试纸进行检测, 每份样本重复测定 3 次, 观察试纸的显色情况。

1.3.7 实际样本检测试验

将编号为 1~42 的猪尿样本以 3000 r/min 离心 15

min, 取上清液作为检测样本。各取 50 μL 用 ELISA 试剂盒检测, 标准曲线定量, 再取 80 μL 用试纸进行检测, 目测判断结果。比较两种不同方法的结果符合率。

2 结果与讨论

2.1 胶体金的鉴定及粒径选择

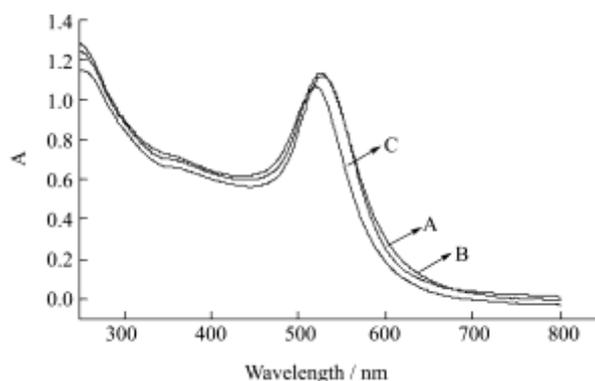


图 1 三种胶体金溶液 200~800 nm 紫外扫描图谱

Fig.1 UV absorbance spectrum of 3 colloidal gold solutions

注: 图中曲线 A、B、C 分别代表柠檬酸三钠溶液的用量为 1.0、1.5、2.0 mL。

肉眼观察三种不同反应投料比制备的胶体金溶液, 颜色皆为酒红色, 色泽鲜艳, 晶莹透亮。紫外光谱仪 200~800 nm 扫描, 图谱如图 1 所示。金溶胶在可见光范围内有单一吸收峰, 最大吸收峰越窄, 说明颗粒越均匀; 随着柠檬酸三钠用量的增加, 金颗粒的直径递减, 最大吸收波长也向短波偏移; 最大吸收吸光度值通常在 0.8~1.2 之间^[12]。图 1 中, 三条曲线主峰基本重合, 峰宽较小, 说明制备的金溶胶颗粒均匀一致; 曲线 C 对应的柠檬酸三钠用量最大, 其最大吸收波长也略微向左偏移; 最大吸收峰吸光度值接近 1.2, 符合应用要求。

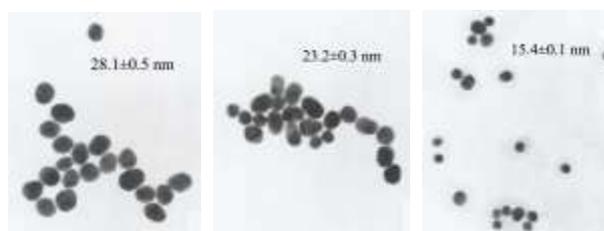


图 2 三种不同粒径胶体金的透射电镜图

Fig.2 TEM photos of different particle diameter of colloidal gold

三种胶体金颗粒的透射电镜扫描图见图 2。在三种胶体金颗粒的大小基本一致, 没有椭圆形、多角形的颗粒。随着还原剂用量的增加, 颗粒大小呈递减趋势。将图片扫描后放大, 随机挑选 10 个颗粒, 计算其

平均粒径, 依次为 28.1±0.5、23.2±0.3、15.4±0.1 nm。

三种不同粒径金颗粒制成试纸后, 随着 CL 浓度的增加, 检测线颜色均逐渐变浅(图略), 呈现较好的梯度, 其中以 15 nm 左右的处理梯度最为明显, 在检测 10 ng/mL 的阳性添加样品时, 检测线已几乎完全消失, 抑制效果显著, 与质控线的红色条带产生鲜明的对比, 结果容易判读, 故选取粒径为 15 nm 的金颗粒作为实验中抗体标记的胶体金溶液。

采用柠檬酸钠还原法是制备胶体金的常用方法, 工艺简便、成本低廉, 粒径均一、单分散性胶体金的制备与制备条件选择、反应时间等因素有密切的关系^[13]。柠檬酸钠和氯金酸的摩尔比可直接决定胶体金的粒径范围^[12]。在胶体金免疫层析中, 检测信号是由于金颗粒在检测线上或质控线上聚集形成, 所以如果金颗粒太小不能产生足够的颜色信号, 如果太大又会遇到空间位阻问题。对不同的检测对象及抗体, 需通过试验确定较适合的粒径大小。

2.2 金标抗体标记条件的确定

2.2.1 最适抗体用量的选择

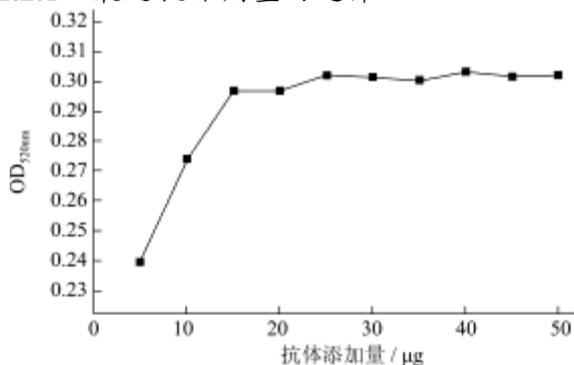


图3 不同抗体添加量制备的胶体金标记物吸光度值

Fig.3 Absorbance of colloidal gold conjugates produced with different amount of MAb

不同抗体添加量制备的胶体金标记物吸光度值的变化情况如图3所示。当每毫升胶体金溶液中单抗添加量等于或大于 15 μg 时, 胶体金-抗体结合物的吸光度值基本趋于平稳, 说明胶体金颗粒对抗体的吸附量基本达到饱和。因此稳定胶体金的最小蛋白用量为每毫升金溶胶中添加 15 μg 抗体, 在此基础上再稍过量 20% 左右, 故最终确定标记时实际蛋白用量为每毫升胶体金溶液中添加 20 μg 抗体。

标记过程中抗体的用量对标记复合物的稳定性十分重要, 若加入的抗体量少, 则不能稳定胶体金, 胶体金溶液会出现由红变蓝的聚集现象; 若加入的抗体量达到或超过稳定胶体金所需要量的时候, 则胶体金溶液保持红色不变。

2.2.2 最适 pH 值的选择

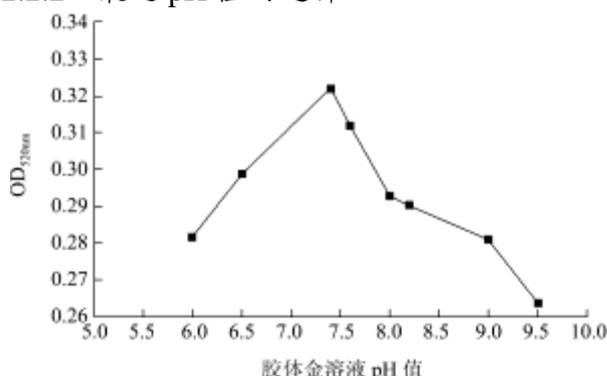


图4 不同 pH 胶体金溶液制备的胶体金标记物吸光度值
Fig.4 Absorbance of colloidal gold conjugates produced in different pH

不同 pH 的胶体金溶液制备的胶体金标记物吸光度值的变化情况如图4所示。当胶体金溶液 pH 值为 7.4 时, 制备的胶体金-抗体结合物的光密度值较高, 说明胶体金颗粒和抗体吸附较好。因此用作标记抗体的胶体金溶液 pH 值选择为 7.4。

为使胶体金颗粒与抗体蛋白获得最强的结合, 应使蛋白中氨基酸带有更多的正电荷, 标记时应将胶体金溶液的 pH 值调节到稍高于抗体蛋白的等电点。本实验所用的 CL 单克隆抗体在 pH 7.0 以上时都可以与胶体金形成复合物, 通过试验选定 pH 7.4 作为胶体金溶液的标记 pH, 可以获得稳定的胶体金标记复合物。

2.2.3 金标抗体的纯化及鉴定

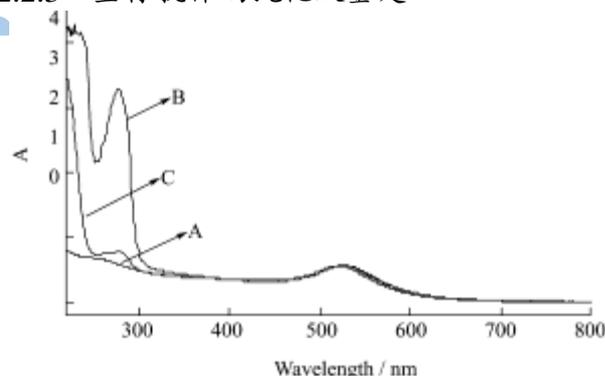


图5 金标抗体纯化前后紫外扫描图谱

Fig.5 UV absorbance spectrum of purified colloidal gold labeled MAb

注: A、B、C 依次为: 胶体金溶液、纯化前金标抗体、纯化后金标抗体。

图5为胶体金溶液、纯化前金标抗体溶液、纯化后金标抗体溶液的紫外扫描图谱。曲线A中, 由于胶体金颗粒的表面等离子共振现象, 故在 519 nm 处有一特征吸收峰; 曲线B中, 由于抗体与胶体金发生结合, 最大吸收峰出现了轻微红移, 移至 525 nm, 同时由于抗体的加入, 在约 280 nm 处出现了一新的吸收

峰；曲线 C 中，在 525 nm 及 280 nm 处同样有特征吸收峰，但由于通过纯化去除了游离的未结合抗体，故其 280 nm 处的吸收峰明显较曲线 B 中的要低得多，表明抗体成功地结合至胶体金颗粒表面，且纯化结果较为理想。

对标记物纯化的目的在于除去未充分稳定的胶体金颗粒及其形成的凝聚物以及未标记的物质^[4]，否则，没有被标记的单抗蛋白可能会改变整个免疫反应的平衡点而影响检测结果。其可能的原因是没有被标记的抗体蛋白与检测样品中的盐酸克伦特罗结合，占据结合位点使标记抗体结合减少，从而影响检测的灵敏度。同时，还可与标记抗体竞争性地结合到质控线处包被的羊抗鼠 IgG 二抗，使质控线颜色变浅。

2.3 试纸检测条件参数的确定

2.3.1 金标抗体稀释缓冲液种类的选择

3 种缓冲液对应的试纸质控线均显色正常（图略），而检测线以磷酸盐缓冲液对应的试纸显色最为清晰明显，表明其对猪尿样品中非特异性物质的抗干扰能力较强，因此金标抗体与包被抗原的结合最为充分。硼酸盐缓冲液、Tris-HCl 缓冲液对应的试纸检测线几乎不显色。故最终选择以磷酸盐缓冲液为金标抗体的稀释缓冲液。

2.3.2 金标抗体稀释缓冲液离子浓度的选择

随着离子浓度从 0.01 mol/L 增加到 0.1 mol/L，试纸上检测线的显色强度先增加后降低。在离子浓度为 0.05 mol/L 的条件下，试纸的检测线显色最为明显，说明包被抗原与金标抗体结合最为充分，故确定抗体稀释缓冲液最适的离子浓度为 0.05 mol/L。

2.3.3 金标抗体稀释缓冲液 pH 值的选择

在 pH 为 6.4、7.4、8.2 三个条件下，试纸中的检测线均显色，但在 pH 值为 7.4 的情况下，检测线的显色最为清晰、明显；表明此 pH 条件最有利于金标抗体与包被抗原的免疫结合，故确定缓冲液的 pH 为 7.4。

不同 pH 对各种抗体蛋白的空间结构、表面带电性和溶解度影响较大，同时也会影响尿样中的离子浓度，这些因素直接影响到抗体蛋白在溶液中的稳定性，进而对试验结果产生很大的影响。

2.3.4 金标抗体稀释缓冲液中 BSA 浓度的选择

三种浓度下，试纸中的金标抗体与包被抗原均发生反应，在检测线处出现红色条带，但在添加量为 0.1% 时，检测线的显色较其他两个更为清晰显著，故确定 BSA 添加量为 0.1%。

在反应体系中添加 BSA、聚乙二醇、聚乙烯吡咯

烷酮等大分子物质，能保护目的抗体蛋白的活性，维持胶体金的胶体稳定，同时它们能降低反应过程中的非特异性结合，促进抗原抗体间反应^[4]。

2.3.5 金标抗体喷涂量的选择

不同金标抗体喷涂量对试纸测试结果有显著影响。喷涂量为 40 $\mu\text{L}/\text{cm}^2$ 时，在测试 3 ng/mL 的猪尿液样品时测试线不显色，灵敏度较高，但其阴性显色过浅，不利于结果的判读；喷涂量为 60 $\mu\text{L}/\text{cm}^2$ 时，不同浓度样品的测试结果均显色，灵敏度较低；而喷涂量为 50 $\mu\text{L}/\text{cm}^2$ 时，试纸的显色梯度最佳，检测灵敏度适中，故选择的喷涂量为 50 $\mu\text{L}/\text{cm}^2$ 。

2.3.6 包被抗原包被浓度的选择

包被浓度较低时（0.3 mg/mL），检测灵敏度较高，但阴性样品显色也变浅，可能增加试纸出现假阳性的风险；包被浓度较高时（0.8 mg/mL），试纸阴性、阳性样品显色反差不大，检测灵敏度降低，达不到检测要求。当包被浓度为 0.5 mg/mL 时，阴性样品显色清晰，条带颜色与质控线相当，阳性样品颜色梯度明显。故选择包被抗原的包被浓度为 0.5 mg/mL。

2.3.7 羊抗鼠 IgG 包被浓度的选择

随着羊抗鼠 IgG 包被浓度的提高，质控线颜色逐渐加深。包被浓度为 1.5 mg/mL 时，质控线与阴性样品接近，但与 3 ng/mL 的阳性样品颜色不易区分，容易造成假阴性的判定；当浓度提高至 2 mg/mL 时，质控线与阴性样品显色接近，与阳性样品差别较明显；若继续提高至 2.5 mg/mL，则质控线颜色过深，与阴性样品差别增大，容易造成假阳性判断。因此，选择 2 mg/mL 作为最终包被浓度。

2.4 试纸的检测限



图 6 试纸检测限试验结果

Fig.6 Results of LOD tests of the strip

注：CL 添加浓度从左至右依次为 0、3、5、10、20 ng/mL。

试纸的检测限试验结果见图 6。检测阴性样品时，检测线与质控线显色相当；当检测浓度为 3 ng/mL 的阳性样品时，检测线几乎不显颜色，故判定试纸的检测限为 3 ng/mL。

2.5 试纸交叉反应试验



图7 试纸条的交叉反应测试结果

Fig.7 Results of cross-reaction tests of the strip

注：溶液浓度均为50ng/mL。

去甲肾上腺素、莱克多巴胺、沙丁胺醇、重酒石酸去甲肾上腺素、硫酸去甲肾上腺素、盐酸肾上腺素这六种药物都是与CL结构相似的β-兴奋剂类药物，由图7可看出，分别添加浓度为50ng/mL的六种结构

相似药物，试纸检测线均显色明显，而50ng/mL的CL阳性样检测结果显示为强阳性，这表明本试验研制的CL胶体金试纸特异性强，与该六种结构类似药物几乎没有交叉反应。

2.6 实际样本检测

试纸和ELISA试剂盒对42份猪尿实际样本的检测结果显示见表1。参照试纸的检测限，对含量大于3ng/mL判断为阳性，小于3ng/mL判断为阴性。试剂盒检测为阳性的22份样品，试纸检测结果均为阳性；试剂盒检测为阴性的20份样品，试纸也检测为阴性。试纸检测结果与ELISA试剂盒检测结果的符合率为100%。

表1 试纸和ELISA试剂盒对42份猪尿样本的检测结果

Table 1 Detection results of 42 swine urine samples with the strip and ELISA kit

编号	试剂盒	试纸												
1	0.08	-	8	5.78	+	15	5.43	+	22	0.56	-	29	5.34	+
2	0.13	-	9	1.04	-	16	5.53	+	23	6.67	+	30	0.18	-
3	2.87	-	10	0.09	-	17	0.63	-	24	3.59	+	31	6.76	+
4	5.78	+	11	4.23	+	18	5.74	+	25	0.76	-	32	6.21	+
5	0.22	-	12	6.89	+	19	0.85	-	26	3.56	+	33	7.58	+
6	0.03	-	13	3.18	+	20	0.12	-	27	4.83	+	34	1.49	-
7	0.97	-	14	0.10	-	21	4.08	+	28	2.28	-	35	3.24	+

注：试剂盒检测数据单位为ng/mL；试纸检测结果中“+”、“-”分别表示阳性和阴性。

3 结论

3.1 研究了胶体金颗粒粒径，标记胶体金的抗体用量和pH值，金标抗体稀释液的种类和离子浓度、pH值、牛血清白蛋白(BSA)添加量，金标抗体喷涂量，包被抗原及二抗包被浓度等各项参数对CL快速检测胶体金试纸性能的影响，并确定了最适反应参数，研制的胶体金试纸可以满足实际检测要求。

3.2 除常用的柠檬酸钠以外，硫氰酸盐、抗坏血酸、白磷、硼氰化钠等也可用作还原剂，进一步的研究可以考虑尝试不同还原剂并与柠檬酸钠进行对比。本研究用HSA作为包被抗原的载体是一次新的尝试，结果表明可以满足检测要求，但也可以进一步对比其与BSA、卵清蛋白(OVA)等常用载体的效果。

参考文献

[1] 文美英,朱志盈.瘦肉精的危害、检测方法与控制[J].肉类工业,2013,2:49-51
Wen Meiyang, Zhu Zhiying. Harm, detection methods and

control of Clenbuterol [J]. Meat Industry, 2013, 2: 49-51
[2] 王秋平,哈婧,刘硕,等.盐酸克伦特罗检测方法的研究进展[J].河北工业科技,2013,30(2): 125-129
Wang Qiuping, Ha Jing, Liu Shuo, et al. Research progress of detection methods of Clenbuterol hydrochloride[J]. Hebei Journal of Industrial Science and Technology, 2013, 30(2): 125-129.
[3] 刘子芝,尹望忠,杜永平等.应用酶联免疫吸附法(ELISA)结合胶体金试纸法快速筛选猪尿中的盐酸克伦特罗残留[J].中国动物检疫,2005,22(11):23-24
Liu Zizhi, Yin Wangzhong, Du Yongping, et al. Rapid screening of Clenbuterol in swine urine with ELISA kits and colloid-gold strips [J]. China animal health inspection, 2005, 22(11): 23-24
[4] Zhang G P, Wang X N, Yang J F, et al. Development of an immunochromatographic lateral flow test strip for detection of β-adrenergic agonist Clenbuterol residues [J]. Journal of Immunological Methods, 2006,312: 27-33
[5] Zhang Mingzhou, Wang Minzi, Chen Zonglun, et al.

- Development of a colloidal gold-based lateral-flow immunoassay for the rapid simultaneous detection of clenbuterol and ractopamine in swine urine [J]. *Anal Bioanal Chem*, 2009, 395: 2591-2599
- [6] Han Jing, Gao Hongfei, Wang Wenwen, et al. Time-resolved chemiluminescence strategy for multiplexed immunoassay of clenbuterol and ractopamine [J]. *Biosensors and Bioelectronics*, 2013, 48: 39-42
- [7] 胡华军,付涛,张明洲,等.CdTe/ZnSe 核壳量子点免疫层析试纸条检测克伦特罗的研究[J].*分析化学研究报告*,2010, 38(12):1727-1731
- Hu Huajun, Fu Tao, Zhang Mingzhou, et al. Development of CdTe/ZnSe core/shell quantum dots-based lateral-flow immunoassay for rapid detection of Clenbuterol[J]. *Chinese Journal of Analytical Chemistry*, 2010, 38(12):1727-1731
- [8] Liu Xueping, Zhang Yifang, Wu Huiwang, et al. Sensitive electrochemical immunosensor for determination of Clenbuterol using gold colloid-mediated hapten immobilization [J]. *Chinese Journal of Analytical*, 2012, (40):1147-1152
- [9] Bing Bo, Zhu Xuejun, Miao Peng, et al. An electrochemical biosensor for clenbuterol detection and pharmacokinetics investigation [J]. *Talanta*, 2013, 113: 36-40
- [10] 姜金庆,杨雪峰,王自良,等.克伦特罗和莱克多巴胺多残留胶体金免疫层析试纸条的研制[J].*畜牧兽医学报*,2013,44(1): 87-94
- Jiang Jinqing, Yang Xuefeng, Wang Ziliang, et al. Development of a monoclonal antibody based colloidal gold immunochromatography strip for multianalysis of Clenbuterol and Ractopamine [J]. *Acta Veterinaria et Zootechnica Sinica*, 2013, 44(1): 87-94
- [11] Laura Anfossi, Claudio Baggiani, Cristina Giovannoli, et al. Optimization of a lateral flow immunoassay for the ultrasensitive detection of aflatoxin M1 in milk [J]. *Analytica Chimica Acta*, 2013, 772: 75-80
- [12] 孙秀兰,赵晓联,汤坚.单分散性胶体金的制备工艺优化[J].*免疫学杂志*,2004,20(2):151-154
- Sun Xiulan, Zhao Xiaolian, Tang Jian. Optimization of preparation technique of monodispersion colloidal gold [J]. *Immunological Journal*, 2004, 20(2): 151-154
- [13] Matthieu Doyen, Kristin Bartik, G Bruylants. UV-Vis and NMR study of the formation of gold nanoparticles by citrate reduction: Observation of gold-citrate aggregates [J]. *Journal of Colloid and Interface Science*, 2013, 399: 1-5
- [14] 毛黎娟.金免疫层析技术在克百威残留快速测定中的应用研究[D].杭州:浙江大学,2005
- Mao Lijuan. Application of gold-immunochromatography technology in rapid detection of Carbofuran residue [D]. Hangzhou: Zhejiang University, 2005