

基于 PtNPs-PV 的双重放大免疫比色法检测肉中 莱克多巴胺痕量残留的研究

陈淑贤¹, 刘静¹, 付田¹, 潘道东^{1,2}, 孙杨赢¹, 曹锦轩¹, 曾小群¹, 吴振¹

(1. 宁波大学浙江省动物蛋白食品精深加工技术重点实验室, 浙江宁波 315211)

(2. 南京师范大学食品科学与营养系, 江苏南京 210097)

摘要: 本文提出了一种免疫比色方法用于检测猪肉中莱克多巴胺的残留。该方法结合了抗原抗体特异性结合的高选择性特点和胶体铂颗粒(PtNPs)与多聚酶螯合物复合物(PtNPs-PV)的信号放大效应,能特异、灵敏地检测样品中痕量的莱克多巴胺(Ractopamine, RAC)残留。多聚酶螯合物(PowerVision, PV)上含有二抗和大量的辣根过氧化物酶(Horseradish Peroxidase, HRP),与抗体特异结合的同时催化底物二氨基联苯胺(3,3'-diaminobenzidine, DAB)产生显色沉淀,并且胶体铂颗粒(PtNPs)也能催化DAB产生显色沉淀与复合物,从而达到双重放大效果。通过测定DAB沉淀吸光度的变化能对应计算样品中莱克多巴胺的残留量。结果表明,在优化的测定条件下,该方法具有较高的检测灵敏度并在0.05~20 ng/mL范围内具有良好的相关性, $R^2=0.992$,检测下限是0.025 ng/mL。所提出的方案具备灵敏度高、选择性强、准确性高且检测速度快等优点,可以适应猪肉中莱克多巴胺残留的现场检测需求。

关键词: PowerVision; PtNPs; 竞争性免疫比色法; 莱克多巴胺

文章编号: 1673-9078(2016)1-278-283

DOI: 10.13982/j.mfst.1673-9078.2016.1.044

Dual-amplified Colorimetric Immunoassay Based on PtNPs-PV for Detection of Ractopamine at Ultra-trace Level in Meat Samples

CHEN Shu-xian¹, LIU Jing¹, FU Tian¹, PAN Dao-dong^{1,2}, SUN Yang-ying¹, CAO Jin-xuan¹, ZENG Xiao-qun¹,
WU Zhen¹

(1. Zhejiang province key laboratory of food deep processing technology of animal protein, Ningbo University, Ningbo 315211, China) (2. Food Science & Nutrition Department of Nanjing Normal University, Nanjing 210097, China)

Abstract: A colorimetric immunoassay for the detection of ractopamine (RAC) residues in pork is presented in this study. This method combined the high selectivity of antigen-antibody specific binding and the signal-amplification effect from the complex of colloidal platinum nanoparticles (PtNPs) and the PowerVision (PV) agent. It could detect RAC residues at ultra-trace levels specifically and sensitively. The secondary antibodies and a large amount of horseradish peroxidase (HRP) contained in the PV agent can specifically bind with antibodies and catalyze the substrate 3,3'-diaminobenzidine (DAB) to generate colored precipitates. PtNPs can also catalyze DAB to produce colored precipitates and complexes, thereby, achieving a double amplification effect. The amount of RAC residues in the sample can be calculated by measuring the changes in the absorbance of DAB precipitation. Under the optimized assay conditions, this method exhibited a high detection sensitivity and a good correlation in the range of 0.05~20 ng/mL with $R^2 = 0.992$ And the detection limit was 0.025 ng/mL. This approach showed many advantages, including high sensitivity, selectivity, and accuracy as well as rapid detection, which can meet the requirement of onsite surveillance of RAC residues in pork.

Key words: PowerVision; platinum nanoparticles (PtNPs); competitive colorimetric immunoassay; ractopamine

β_2 受体激动剂(β_2 -adrenergic agonists)因可缓解

收稿日期: 2015-01-24

基金项目: 浙江省公益性项目(2014C32051), 国家支撑计划(2012BAK08B01-2), 国家水禽产业体系(GARS-43-17)

作者简介: 陈淑贤(1989-), 女, 硕士研究生, 研究方向: 食品安全检测

通讯作者: 潘道东(1964-), 男, 教授, 博士生导师, 主要从事畜产品加工及检测技术研究

哮喘症状, 从而常被作为兽药使用; 同时由于其有增长肌肉、减少脂肪蓄积等功能也常被添加到饲料中^[1]。莱克多巴胺作为 β_2 受体激动剂的一员是一种人工合成的克仑巴安, 正被作为一种新型瘦肉精在一些养猪场使用^[2]。我国农业部、卫生部、国家食品药品监督管理局联合发布的《禁止在饲料和动物饮用水中使用的药物品种目录》中规定禁止莱克多巴胺作为生长促进剂

在饲料中使用。因此,一种快速、高灵敏的莱克多巴胺痕量残留检测方法是保证食品安全的重要手段。

目前,大量的检测手段已经研究并用于莱克多巴胺的检测,其中较精确可靠的如气相色谱(GC)、液相色谱(LC)以及它们与质谱联用法(GC-MS、LC-MS)^[3-5]。但它们都存在仪器操作复杂、仪器昂贵、耗时长等问题,这些问题使得它们很难用于现场快速筛查。快速检测试纸条虽然方便但仅能做到定性,不能定量。因此,比色法检测应运而生,它既结合了传统的抗原抗体的特异性,同时有比色法的低成本及快速响应性,从而在食品、医学等方面有其巨大的应用价值。市场上使用的ELISA试剂盒虽然快捷有效,但仍存在检测限太高的问题,已经难以适应现今禁止添加的要求而存在假阴性。我们致力于寻找一种高聚HRP酶载体以达到信号放大的方法。

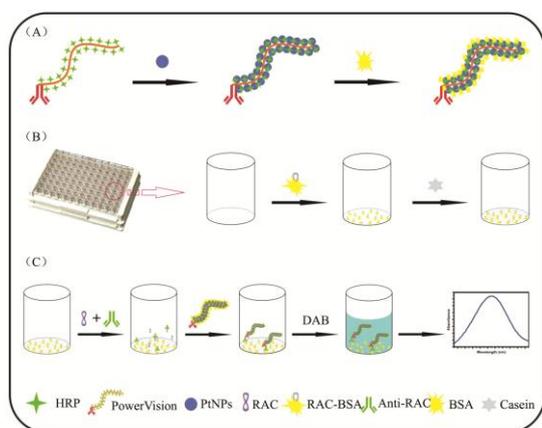


图1 竞争性免疫检测原理图

Fig.1 Schematic diagram of the competitive immunoassay

注:信号探针的制备过程(A);酶标板包被莱克多巴胺偶联抗原(RAC-BSA)(B);免疫复合物制备及显色检测(C)。

PowerVision (PV)是一种多聚酶螯合物,含有二抗和大量HRP酶^[6],相较于传统酶标抗体,该试剂增加了单位抗体上标记的HRP酶,通过增加HRP酶含量的方法达到信号放大的目的。由于其超强的放大效应,该试剂常被应用于免疫组化实验以达到高效染色目的。同时,FAN Jia^[7]等对胶体铂颗粒(PtNPs)催化效应有一定研究,并发现PtNPs对HRP催化底物DAB有很强催化效应。并且,PtNPs合成步骤简单、颗粒稳定、有很强的生物相容性,能与酶蛋白结合且不会影响其催化效应,常被用来负载蛋白酶。因此,我们通过PtNPs标记PV来代替传统试剂盒的酶标抗体,共同催化底物DAB产生颜色变化,以达到双重放大效果,从而实现食品中莱克多巴胺痕量残留的快速、灵敏、高特异性检测。具体实验原理如图1中所示。但是,目前国内外还没有公开任何关于利用

PtNPs-PV复合物作为酶标抗体来检测莱克多巴胺的免疫比色法的相关研究报道。

1 材料与方法

1.1 实验仪器与试剂

莱克多巴胺ELISA检测试剂盒、莱克多巴胺偶联抗原(RAC-BSA)、莱克多巴胺抗体(anti-RAC)和克伦特罗购自北京华安麦科生物技术有限公司。PV购自北京中杉金桥公司。RAC(99%)购自德国Dr. Ehrenstorfer有限公司。沙丁胺醇、氯铂酸、硼氢化钠购自阿拉丁化学试剂。盐酸多巴胺以及酪蛋白购自Sigma-Aldrich公司。二氨基联苯胺(DAB)购自北京伯乐生命科学发展有限公司。牛血清白蛋白(BSA)购自北京索莱宝科技有限公司。磷酸盐缓冲液(PBS, 0.01 mol/L pH 7.2~7.4)购自北京索莱宝科技有限公司。实验所用PBST洗液由PBS(0.01 mol/L pH 7.2~7.4)和0.05%(V/V)Tween 20混合而成。酶标仪为TECAN Infinite 200 PRO,扫描波段为230~1000 nm。透射电镜为日本日立H600透射电子显微镜。

1.2 PtNPs的制备

胶体铂颗粒的制备参照YAN Zhong-dan等^[8]所报道的方法合成。为了制备胶体铂颗粒,所有的玻璃器皿都预先经王水浸泡。在烧杯中加入2 mL 1%的氯铂酸,轻搅5 min后迅速加入5 mL 10 mmol/L的硼氢化钠还原,室温下剧烈搅拌,反应液迅速变为黑灰色。反应结束后通过离心分离除去杂质,反复清洗至少3次,最后定容至2 mL,在4℃条件下保存备用。

1.3 信号标签的制备

在低温条件下,取步骤1.2中所制备的胶体铂颗粒1 mL,轻微搅拌一段时间,在搅拌条件下缓慢滴加1 mL PV试剂并搅拌过夜;在低温条件下,向制好的PtNPs-PV复合物中加入1% BSA以封闭PtNPs上多余的键位,在4℃条件下保存备用。

1.4 酶标板包被抗原

酶标板包被参照李轶等^[9]所报道的方法并加以相应修改。在空白的96孔酶标板中每孔加入100 μL 3 μg/mL RAC-BSA作为包被原进行酶标板的包被。该酶标板在4℃条件下孵育过夜,并用PBST洗板三次,以除去游离的RAC-BSA;经清洗后的酶标板用3%酪蛋白溶液作为封闭液对多余位点进行封闭,每孔加入200 μL,4℃孵育过夜,PBST洗板3次。

1.5 免疫复合物的制备

该免疫复合物由包被于酶标板板底的莱克多巴胺抗原、抗体、PtNPs-PV 复合物组成,其合成方法参照莱克多巴胺 ELISA 检测试剂盒的操作步骤。板底所包覆的莱克多巴胺偶联抗原与样品中的莱克多巴胺游离单体竞争所加入的抗体。通过洗板去除游离的抗原抗体结合物以及其它游离物仅余固定在板底的抗体。再加入 PtNPs-PV 复合物与板底的抗体特异结合,经孵育和洗板,留下莱克多巴胺抗原、抗体、PtNPs-PV 所组成的免疫复合物。该免疫复合物的量随样品中莱克多巴胺的增加而减少,呈竞争性关系。最后加入 DAB 显色,进行比色分析。

1.6 真实样品检测

真实样品的处理过程根据莱克多巴胺检测试剂盒的操作步骤^[10]并作少量改变。准确称量 1.00 ± 0.05 g 猪肉样品,装入离心管中,并向离心管里加入 50 mL 0.01 mol/L pH=7.4 的磷酸盐缓冲液,使用高速分散器充分涡动混匀;分别加入适量的莱克多巴胺,超声振荡 15 min,然后在 4 °C 下离心 5 min,取上清液,加入 2 M 氢氧化钠溶液调节 pH 值至 6.5~7.5,静置 5 min,取上清液 20 μ L 在 4 °C 下保存备用。具体分析方法根据 1.5 中所述的免疫复合物制备过程进行,得到的免疫复合物中加入 DAB 的 A 液和 B 液各 50 μ L,避光孵育;所得到的 DAB 显色产物通过酶标仪测定吸光度。

1.7 数据统计

Origin 9.0.0 (OriginLab OriginPro 9.0.0, Origin, Electronic Arts Inc, Cary, Microsoft Windows, USA, 2011) 用于数据分析和绘图。

2 结果与讨论

2.1 信号探针的表征

为了验证本文所提出的信号探针的合成是否成功,我们分别用透射电镜和紫外分光光度计对其进行表征。图 2a 为胶体铂的透射电镜图,单纯的胶体铂颗粒粒径较小,大约在 8 nm 左右,通过 TEM 电镜图 2a 和图 2b 的对比可以看出,相对于单纯的胶体铂颗粒,结合了 PowerVision 的胶体铂有明显的阴影,这表明胶体铂颗粒和 PowerVision 确实有结合。

为了进一步证明,我们使用紫外分光光度计对单纯的胶体铂颗粒、PowerVision 试剂以及它们的结合物

进行表征,结果如图 3 所示。单纯的胶体铂颗粒在 230~1000 nm 范围内无明显吸收峰,仅在 300 nm 以下有一定吸光度,见图 3a。单纯的 PV 在 280 nm、376 nm、506 nm 处有吸收峰,如图 3c 所示。图 3b 为用 BSA 封闭后的信号探针,它同时拥有单纯的胶体铂颗粒和 PV 的特征吸收峰,其较大的蛋白吸收峰部分来源于 BSA。这说明胶体铂和 PowerVision 试剂结合而成的 PtNPs-PV 复合物已成功合成。

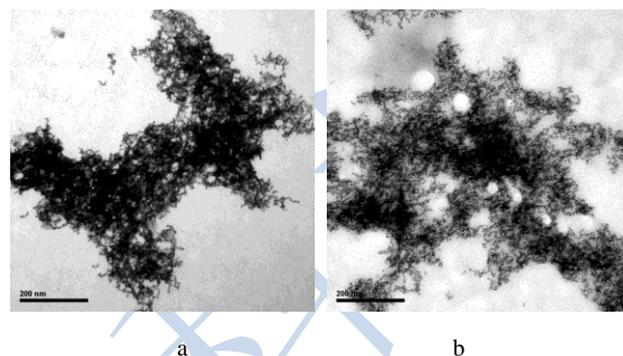


图 2 信号探针的 TEM 表征

Fig.2 Characterization of signal probes by TEM

注:单纯的 PtNPs 颗粒 (a) 和 PtNPs-PV 复合物 (b)。

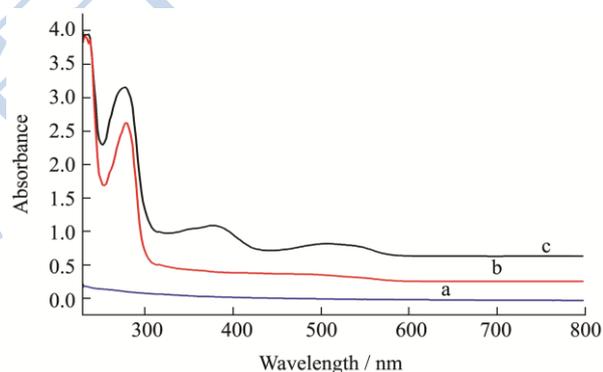


图 3 免疫复合物的 UV-Vis 表征

Fig.3 Characterization of the immune complex by UV-Vis

注:单纯的胶体铂颗粒 (a)、PtNPs-PV 复合物 (b) 以及 PowerVision (c)。

2.2 特异性、重现性和稳定性

为了评估所提出的胶体铂-多聚酶双重放大比色法检测莱克多巴胺的方法特异性,我们将包括沙丁胺醇 (SAL),克伦特罗 (CLE) 和多巴胺 (DOA) 等多种 β -agonists 作为干扰物质进行检测,结果如图 4 所示。实验在最优条件下检测 8.1 ng/mL 的莱克多巴胺、多巴胺、沙丁胺醇、克伦特罗的纯样。从结果可知,该方法能检测到 8.1 ng/mL 的莱克多巴胺,但是对相同浓度的多巴胺、沙丁胺醇、克伦特罗没有显著反应,这是由于该方法利用了免疫反应抗原抗体特异性结合的原理,这使得该方法的特异性较高。同时,还检测

了 8.1 ng/mL 沙丁胺醇、克伦特罗、多巴胺与同质量莱克多巴胺的混合物以及上述多种 β -agonists 的混合物。从结果可知, 这些干扰物对该免疫反应结果没有显著影响, 并且这些干扰物的混合对检测结果也没有显著影响, 交叉反应结果均小于 1%。结果表明所提出的免疫方法对莱克多巴胺的实时监测具有极高特异性。

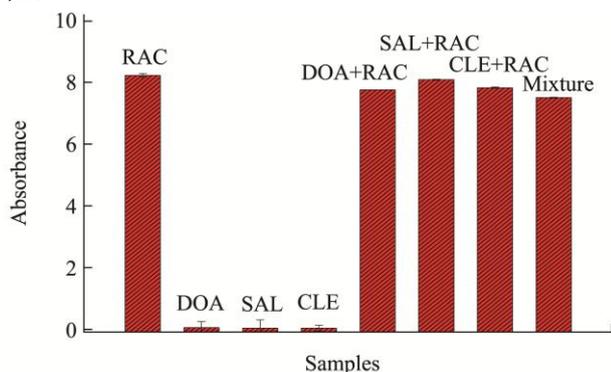


图4 所提出的胶体铂-多聚酶双重放大比色法检测莱克多巴胺的方法特异性

Fig.4 Specificity of the proposed PtNPs-PV dual amplified colorimetric method to detect RAC

注: 图中从左到右分别为 8.1 ng/mL 的莱克多巴胺、多巴胺、沙丁胺醇、克伦特罗和 8.1 ng/mL 的多巴胺、沙丁胺醇、克伦特罗与莱克多巴胺的混合物以及上述所有成分的混合物。

该免疫放大反应的重现性根据批内、批间的变异系数 (CV) 进行评价。用同一批信号探针 PtNPs-PV 复合物对低、中、高浓度 (0.3 ng/mL、2.7 ng/mL、8.1 ng/mL) 的 3 份 RAC 标准品重复测定 10 次, 进行批内试验。3 份 RAC 标准品的批内变异系数分别为 2.8%、3.6%、3.4%。对同一份 RAC 标准品连续测定 10 d 进行批间试验。3 份 RAC 标准品的批间变异系数分别为 3.1%、3.7%、3.5%。

此外, 合成的免疫信号探针 PtNPs-PV 复合物在 4 °C 下保存 30 d 观察其稳定性, 发现与刚合成的时候相比仍有 98.1% 的效应。这说明信号探针具有良好的贮存稳定性。

2.3 条件优化

为了使所提出的免疫放大反应达到最佳状态, 我们对可能影响其效率的孵育温度进行了优化。反应的温度可能会影响抗体的活性从而影响检测结果。为此, 我们研究了 20 °C 到 50 °C 范围内温度对免疫反应结果的影响。从图 5 可以看出, 在较低温度条件下, 吸光度随着温度的升高而增大, 温度在 35~40 °C 时检测到的反应产物吸光值较大, 此后随温度的持续升高, 吸光值下降。这可能是由于低温下 PV 上的 HRP 酶活性

受到一定的抑制, 而高温可能引起蛋白结构变化甚至失活。因此, 实验过程中控制温度在 37 °C 使反应达到最佳条件。

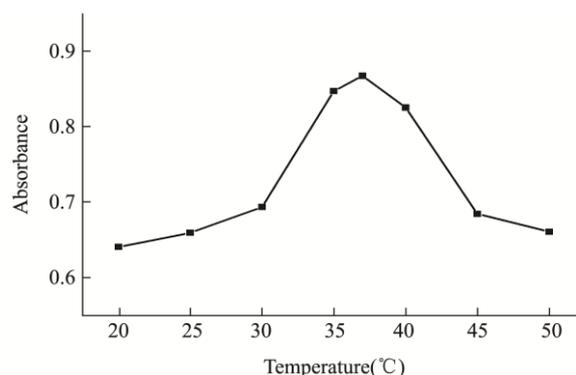


图5 不同孵育温度对检测结果的影响

Fig.5 Influence of different incubation temperatures on the test results

2.4 不同信号探针的放大效应

实验通过对比 ELISA 试剂盒中的 HRP 酶标记抗体、单纯的 PV 以及 PtNPs-PV 复合物的催化效应得到不同的信号探针的放大效果。在优化条件下用竞争法测浓度分别为 0.05、0.1、0.3、0.9、2.7、8.1 ng/mL 的莱克多巴胺样液在使用不同信号探针时对 DAB 的催化效果。实验结果如图 6 所示, 图 6a 为 HRP 酶标记抗体作为信号探针, 图 6b 对应单纯的 PV, 图 6c 代表 PtNPs-PV 复合物的催化效应。对比各曲线可以发现, 在使用 ELISA 试剂盒 HRP 酶标记抗体作为信号探针时, DAB 的显色结果随抗原量的增加而下降, 但是下降的趋势不够明显, 在抗原浓度较低时变化趋势较小; 在使用单纯的 PV 作为信号探针时, 显色结果变化较使用 ELISA 试剂盒的 HRP 酶标记抗体作为信号探针时大, 然而对低浓度抗原的检测效果不够明显; 本文所提出的 PtNPs-PV 复合物做为信号探针对显色底物 DAB 的催化作用明显, 其检测结果符合传统 ELISA 的检测趋势, 同时放大效果显著。

所提出的 PtNPs-PV 复合物作为信号探针对显色底物 DAB 的催化效果是由于 PV 和 PtNPs 胶体颗粒的双重放大。PV 作为一种高聚酶螯合物, 拥有极高含量的 HRP 酶, 能高效催化底物 DAB。同时单纯的 PtNPs 胶体颗粒对显色底物 DAB 也有明显的催化效果, 如图 7 所示, 从正下方顺时针分别为 DAB 原液和不同浓度 (浓度逐渐增加) 的 PtNPs 胶体颗粒对一定量 DAB 的催化结果以及 PtNPs 胶体颗粒原液。从图中可以发现, 随着 PtNPs 胶体颗粒浓度的增加, 其对 DAB 的催化效果相应增加。因此, 本文用 PtNPs-PV 复合物作为信号探针能够实现双重放大从而实现高灵

敏度检测的目的。

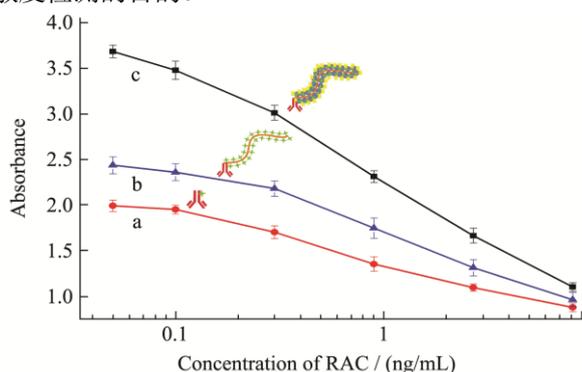


图6 不同的信号探针的催化效果图

Fig.6 Catalytic effect of different signal probes

注: HRP 酶标记抗体 (a)、PV (b) 以及 PtNPs-PV (c)。



图7 PtNPs 对底物 DAB 催化效果图

Fig.7 DAB catalyzed by PtNPs

注: 从正下方顺时针分别为 DAB 原液和不同浓度 (浓度逐渐增加) 的 PtNPs 对 DAB 的催化结果以及 PtNPs 原液。

2.5 标准曲线

表1 所述免疫比色法与其他方法的比较

Table 1 Comparison of the proposed method with other reported methods for RAC detection

检测方法	检测限/(ng/mL)	检测范围/(ng/mL)	文献号
MEPS-HPLC-UV	3	10~2000	DU Wei 等 ^[11]
气相色谱-质谱法	0.5	5~100	王培龙等 ^[12]
荧光淬灭横向流动传感器	0.16	0.32~5.00	SHI Cong-ying 等 ^[13]
ELISA 方法	0.1	0.098~25	王凤侠等 ^[14]
本文方法	0.025	0.05~20	

表2 所述方法与传统 ELISA 方法对实际样品检测结果的比较

Table 2 Comparison of RAC levels in pork samples by using the proposed method and traditional ELISA

样品编号	本文方法/(ng/mL)				ELISA 方法/(ng/mL)			
	实测值/(ng/mL)	加标量/(ng/mL)	测量值/(ng/mL)	回收率/%	实测值/(ng/mL)	加标量/(ng/mL)	测量值/(ng/mL)	回收率/%
1	-	0.10	0.11 ± 0.03	110	-	0.10	-	-
2	-	1.00	0.98 ± 0.02	98.0	-	1.00	1.02 ± 0.01	102
3	-	5.00	5.06 ± 0.02	101	-	5.00	5.03 ± 0.03	101

注: - 表示未检出。

2.6 真实样品分析

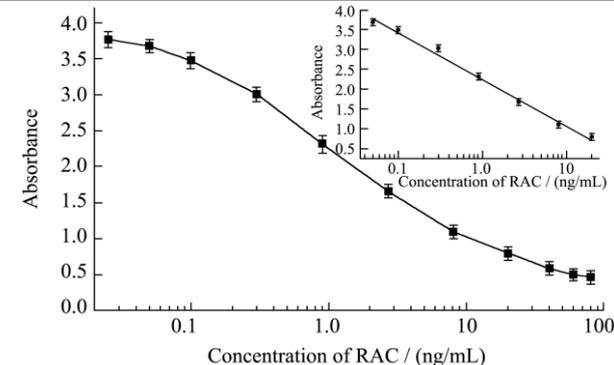


图8 不同浓度 RAC 存在下, 反应结果吸光度与 RAC 浓度的关系

Fig.8 Relationship between the absorbance and RAC concentration

在最优条件下, 用所提出的免疫比色方法检测不同浓度的莱克多巴胺, 结果如图 8 所示。所测浓度分别为 0.025、0.05、0.1、0.3、0.9、2.7、8.1、20、40、80 ng/mL 时, 莱克多巴胺的浓度与吸光值的关系呈现较为完整的倒“S”型曲线。同时, 浓度在 0.05-20 ng/mL 时, 浓度与吸光值呈线性关系, 如图 8 右上角的附图所示, 该线性方程是 $y = 2.24 - 1.17 \log C_{RAC}$, $R^2 = 0.992$ 。该方法的检测限达到 0.025 ng/mL, 能实现现场高灵敏检测。表 1 所示为本方法与文献报道的相比较, 从表 1 可以看出基于 PtNPs-PV 的双重放大免疫比色法有较高的灵敏度, 其检测限低, 仪器简单。这表明 PtNPs-PV 复合物可以显著放大信号从而实现环境中痕量 RAC 的检测。

为了进一步测试所提出的 PtNPs-PV 复合物双重放大免疫比色法的应用性, 我们对市售猪肉样品进行

了检测,检测结果列于表2中。该免疫比色法的回收率在98.0%到110%之间。实验分别用所提出的方法与传统的ELISA方法对市售猪肉样品中莱克多巴胺残留含量进行检测。通过对两者的对比可知,本文提出的PtNPs-PV复合物双重放大免疫比色法对真实样品中的莱克多巴胺量的检测结果与使用ELISA方法所得到的相一致;而加标量为0.10 ng/mL时,传统的ELISA方法没有检出。这表明所述的PtNPs-PV复合物双重放大免疫比色法能实现莱克多巴胺可靠、高灵敏检测。

3 结论

综上所述,本文提出了一种以胶体铂颗粒与多聚酶螯合物的交联复合物PtNPs-PV为信号探针的竞争性免疫比色方法。PtNPs-PV复合物上的PV试剂是一种多聚酶螯合物,拥有极高的酶-抗体比,其大量的HRP酶能高效催化DAB显色以达到信号放大的目的;同时,PtNPs有极好的生物相容性,对DAB也有较好的催化作用,从而实现双重放大,提高了RAC的检测限和线性范围。本研究提出的免疫比色法痕量检测RAC有良好的重现性和稳定性,线性范围较宽,检测限低等众多优势,适合现场快速、高灵敏检测。

参考文献

- [1] CHEN Cheng, MENG Ling-chen, LI Mei-xian, et al. Simultaneous separation and sensitive detection of four β_2 -agonists in biological specimens by ce-uv using a field-enhanced sample injection method [J]. Analytical Methods, 2015, 7(1): 175-180
- [2] Yan H, Xu D, Meng H, et al. Food poisoning by clenbuterol in china [J]. Quality Assurance and Safety of Crops & Foods, 2015, 7(1): 27-35
- [3] WU Jun-lin, LIU Xiao-yun, PENG Yun-ping. Determination of ractopamine in pig hair using liquid chromatography with tandem mass spectrometric detection [J]. Journal of Pharmacological and Toxicological Methods, 2014, 69(3): 211-216
- [4] YONG Jiang, NI Yong-nian. Automated headspace solid-phase microextraction and on-fiber derivatization for the determination of clenbuterol in meat products by gas chromatography coupled to mass spectrometry [J]. Journal of Separation Science, 2014
- [5] WANG Pei-long, WANG Xiao, ZHANG Wei, et al. Development of "one-pot" method for multi-class compounds in porcine formula feed by multi-function impurity adsorption cleaning followed ultra-performance liquid chromatography-tandem mass spectrometry detection [J]. Journal of Chromatography B, 2014, 947: 192-200
- [6] SHI Shan-rong, Guo James, Cote, Richard, et al. Sensitivity and detection efficiency of a novel two-step detection system (powervision) for immunohistochemistry [J]. Applied Immunohistochemistry & Molecular Morphology, 1999, 7(3): 201
- [7] FAN Jia, YIN Jun-jie, NING Bo, et al. Direct evidence for catalase and peroxidase activities of ferritin-platinum nanoparticles [J]. Biomaterials, 2011, 32(6): 1611-1618
- [8] YAN Zhong-dan, XIONG Ping, GAN Ning, et al. A novel sandwich-type noncompetitive immunoassay of diethylstilbestrol using β -cyclodextrin modified electrode and polymer-enzyme labels [J]. Journal of Electroanalytical Chemistry, 2015, 736: 30-37
- [9] 李轶,范大明,顾震南,等.冷冻鱼糜中微生物谷氨酰胺转氨酶ELISA检测方法的建立及应用[J].现代食品科技, 2014, 30(9):275-279
- [10] LI Yi, FAN Da-ming, GU Zhen-nan, et al. ELISA-based method to detect microbial transglutaminase in frozen surimi [J]. Modern Food Science and Technology, 2014, 30(9): 275-279
- [10] 宋建勋.莱克多巴胺残留ELISA检测试剂盒的研制[D].广东:暨南大学,2012
- [11] SONG Jian-xun. Development of ELISA kit for detecting ractopamine residues in meat [D]. Guang Dong: Jinan University, 2012
- [11] DU Wei, ZHAO Gang, FU Qiang, et al. Combined microextraction by packed sorbent and high-performance liquid chromatography-ultraviolet detection for rapid analysis of ractopamine in porcine muscle and urine samples [J]. Food Chemistry, 2014, 145: 789-795
- [12] 王培龙,范理,苏晓鸥,等.分子印迹固相萃取-气相色谱-质谱法测定猪尿中4种 β -受体激动剂[J].分析化学, 2012, 40(3): 470-473
- [12] WANG Pei-long, FAN Li, SU Xiao-ou, et al. Determination of four kinds of β -agonists in swine urine by molecularly imprinted solid phase extraction followed gas chromatography coupled mass spectrometry [J]. Chinese Journal of Analytical Chemistry, 2012, 40(03): 470-473
- [13] SHI Cong-ying, DENG Ning, LIANG Jia-jie, et al. A fluorescent polymer dots positive readout fluorescent quenching lateral flow sensor for ractopamine rapid detection [J]. Analytica Chimica Acta, 2015, 854: 202-208

[14] 王凤侠,张艳,何金兴,等.莱克多巴胺抗体的制备与评价[J].
现代食品科技,2007,23(9):1-4
WANG Feng-xia, ZHANG Yan, HE Jin-xing, et al.
Production and evaluation of a antibody against ractopamine

[J]. Modern Food Science and Technology, 2007, 23(9): 1-4

