

# 免疫荧光层析法快速检测猪尿中克伦特罗含量

郭诗静, 唐海波, 齐维

(广州万孚生物技术股份有限公司, 广东广州 510663)

**摘要:** 本研究使用克伦特罗免疫荧光层析试剂盒, 基于免疫荧光层析原理, 配套使用广州万孚生物技术股份有限公司研制的荧光定量检测仪, 实现猪尿中所含克伦特罗的定量检测, 并对试纸条的灵敏度、准确度与精密性、类似化学药物干扰、保存期等相关性能进行了评价。实验证明检测限达 0.26  $\mu\text{g/L}$ , 与结构类似化学药物的交叉反应小于 0.20%, 同时验证了本试剂盒在 1 年的保存期限有效。整个检测过程只需 20min 左右。

**关键词:** 克伦特罗; 免疫荧光层析法; 检测

文章编号: 1673-9078(2013)5-1154-1156

## Rapid Detection of Clenbuterol Content in Pig Urine by Immunofluorescence Chromatography

GUO Shi-jing, TANG Hai-bo, QI Wei

(Guangzhou Wondfo Biotech Co.,Ltd, Guangzhou 510663, China)

**Abstract:** Quantitative detection of the clenbuterol in pig urine was investigated with a clenbuterol kit based on immunofluorescence chromatography and a fluorescence quantitative detector. The detection limit was up to 0.26  $\mu\text{g/L}$  and the cross-reaction with the chemical drugs of similar structure was less than 0.20%. And the experiment confirmed that the kit had 1-year shelf life. The total detection process just takes about 20 minutes.

**Key words:** clenbuterol; immunofluorescence chromatography; detection

克伦特罗 (Clenbuterol) 俗称瘦肉精, 是一种  $\beta_2$ -肾上腺素受体激动剂, 临床上经常用来治疗慢性阻塞性肺病, 亦被作为缓和气喘急性发作时的支气管扩张用药。由于其毒副作用明显, 包括我国在内的许多国家已严禁克伦特罗在畜牧生产中使用。

目前检测动物组织中克伦特罗的方法较多, 有色谱法、质谱与色谱联用法、电化学法、免疫酶法等<sup>[1]</sup>。色谱法和质谱-色谱联用法等仪器法的灵敏度和准确度较高, 有些方法的灵敏度能达到 0.1  $\text{ng/g}^{[2-3]}$ , 一般为确证方法, 但由于仪器昂贵、操作复杂, 不适用于基层单位的大规模样本筛检。而筛查方法用得较多的是胶体金法, 该法简便快捷, 成本低, 但灵敏度略显不足, 且一般只能定性, 目前市售产品的灵敏度多为 3  $\mu\text{g/L}$ ~5  $\mu\text{g/L}$ 。

为此, 我公司研制了克伦特罗免疫荧光层析试剂盒及“安测”荧光定量仪, 该系统能初步实现对猪尿

收稿日期: 2012-12-11

项目支持: 广东省发改委工程实验室建设项目 (粤发改高技术 [2010]1286 号)

作者简介: 郭诗静 (1983-), 女, 硕士, 主要从事快速诊断试剂研究

通讯作者: 唐海波

中克伦特罗的定量检测, 同时也具有胶体金试纸条的快速、方便等特点, 是一种很有应用前景的方法。现将其性能评价结果报告如下。

### 1 材料与方 法

#### 1.1 试剂与仪器

标准品: 克伦特罗、莱克多巴胺、沙丁胺醇、酒石酸托特罗定、盐酸特布他林、盐酸环仑特罗、盐酸妥洛特罗均购自中国食品药品检定研究院。

克伦特罗荧光层析试剂盒: 由万孚公司研制。

“安测”荧光定量仪: 由万孚公司研制。

猪尿样本: 收集自本地屠宰场。

标准品稀释液: 取 10 份阴性猪尿等比例混合。

#### 1.2 测定原理

采用竞争性免疫荧光层析法检测猪尿中克伦特罗浓度, 将样本与各试剂混合后滴加至检测卡的加样孔中, 在层析作用下反应复合物沿着硝酸纤维素膜向前移动, 包被在膜上的抗原与样本中的克伦特罗竞争结合荧光标记的抗体。样本中所含药物越多, 膜上聚集的复合物则越少, 荧光信号强度便越弱。通过荧光定量仪扫描荧光信号强度, 与标准曲线所拟合的方程进

行换算, 可得出样本中克伦特罗的浓度。

### 1.3 实验方法

#### 1.3.1 样本与试剂盒准备

1.3.1.1 样本: 取本地屠宰场采集的 10 份猪尿, 经 ELISA 法测定为阴性 (克伦特罗药物浓度小于 0.10 μg/L)。

1.3.1.2 试剂盒: 含检测卡、ID 芯片和缓冲液。检测卡类似于胶体金测试卡, 其硝酸纤维素膜上包被有抗原, 缓冲液中含有荧光标记的抗体。使用时缓冲液提前恢复到室温。

#### 1.3.2 检测步骤

克伦特罗荧光层析试剂盒主要由检测卡、荧光试剂组成。

按试剂盒说明书操作如下:

实验前, 将缓冲液和样本平衡至室温, 取检测卡水平放置待加样。

检测在室温下进行, 取 50.00 μL 猪尿样本, 与 200.00 μL 荧光试剂充分混合, 然后取 80.00 μL 混合液滴加至检测卡加样孔中, 室温下水平放置 15 min 后将检测卡插入荧光定量仪 (确保已插入 ID 芯片) 中, 仪器将自动读取并显示测试结果。

#### 1.3.3 标准曲线的建立

使用标准品稀释液, 配制 0.00、0.20、0.50、1.00、2.00、4.00、8.00 μg/L 梯度浓度的克伦特罗标准品, 测试信号值, 并构建拟合计算方程式。将定量方程式录入荧光定量仪备用。

#### 1.3.4 灵敏度测试

灵敏度以检测限表示, 按 2.3.2 中的检测步骤, 测试 10 份阴性猪尿, 检测限等于阴性样本测定均值加上 3 倍标准差。

#### 1.3.5 准确度测试与精密性测试

取 10 份阴性猪尿样本, 每份分别添加低、中、高 3 个浓度的克伦特罗标准品, 分别为 0.50 μg/L、2.00 μg/L、8.00 μg/L, 按 2.3.2 中的方法检测, 计算各样本

表 2 阴性样本检测结果 (n=10)

Table 2 Results of the detection of negative samples

样本编号	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10
测试结果/(μg/L)	0.09	0.10	0.19	0.08	0.19	0.14	0.09	0.16	0.10	0.17

### 2.3 准确度测试与精密性测试

表 3 添加回收试验结果 (n=10)

Table 3 Results of recovery test

添加浓度	0.5(g/L)	2.0/(μg/L)	8.0/(μg/L)
平均值/(μg/L)	0.57	2.13	7.75
平均回收率/%	114.60	106.70	96.80
精密性 CV/%	6.90	4.50	7.30

的回收率与测试精密性。

#### 1.3.6 类似化学药物干扰试验

对 β-兴奋剂类似化学药物进行交叉反应的测定, 在阴性尿样中添加莱克多巴胺、沙丁胺醇、酒石酸托特罗定、盐酸特布他林、盐酸环仑特罗、盐酸妥洛特罗 6 种药物, 添加浓度均为 100.00 μg/L, 用克伦特罗试剂盒进行定量检测。

#### 1.3.7 保存期测试

由于检测卡为常温保存, 荧光试剂为 2~8 °C 冷藏保存, 本实验测试试剂盒在 1 年的保存时间是否有效。

按常理, 将检测卡放置于 50 °C 1 个月未变质, 相当于室温 1 年有效; 荧光试剂 37 °C 放置 7 d, 相当于 4 °C 1 年有效。

本实验将检测卡放置于 50 °C 1 个月、荧光试剂 37 °C 放置 7 d 加速反应后, 测试阴性与阳性添加回收率, 各设计 10 个平行测试。

## 2 结果与分析

### 2.1 标准曲线的建立

表 1 标准点测试结果

Table 1 Results of the detection of substance solution

标准品浓度 (μg/L)	0	0.2	0.5	1.0	2.0	4.0	8.0
测试信号值	6.02	5.22	4.79	3.94	2.86	2.08	1.36

其中, 拟合曲线方程为  $y=3.93289-3.1661x-0.900605x^2+1.41094x^3$ , y 代表测试信号值, x 代表对应标准品浓度的对数值 lgC, 曲线相关系数 R 为 0.99944。

### 2.2 灵敏度测试

灵敏度以检测限表示, 结果见表 2。10 份阴性样本的平均值为 0.13 μg/L, 标准差为 0.04 μg/L, 检测限等于平均值加上 3 倍标准差, 说明本试剂盒检出限可达 0.26 μg/L。

结果见表 3, 10 份阴性猪尿中分别添加 0.50 μg/L、2.00 μg/L、8.00 μg/L 的克伦特罗标准品, 高中低浓度的添加回收满足 100±20%, 实验说明检测方法定量准确。

测试结果显示, 对样本的平行测试 CV 值分别为 6.90%、4.50%、7.30%, 说明试剂盒批均一性良好。

### 2.4 类似物干扰试验

对  $\beta$ -兴奋剂类似化学药物进行交叉反应的测定, 各药物添加浓度为 100.00  $\mu\text{g/L}$ , 结果见表 4。

表 4, 交叉反应测试

Table 4 Results of the cross-reactivity

添加药物	测试结果/ $(\mu\text{g/L})$	交叉反应率/%
莱克多巴胺	<0.20	<0.20
沙丁胺醇	<0.20	<0.20
酒石酸托特罗定	<0.20	<0.20
盐酸特布他林	<0.20	<0.20
盐酸环仑特罗	<0.20	<0.20
盐酸妥洛特罗	<0.20	<0.20

以上测试的 6 种类似物用克伦特罗试剂盒检测, 未出现阳性反应, 数据显示其交叉反应率均低于 0.20%。

### 2.5 保存期测试

为测试荧光定量试剂盒是否可长期保存备用, 实验中将检测卡 50  $^{\circ}\text{C}$  密闭真空包装放置 1 个月模拟常温保存 1 年, 而荧光试剂于 37  $^{\circ}\text{C}$  包装好放置 7 d 模拟 4  $^{\circ}\text{C}$  保存 1 年。通过升温加速反应, 考察试剂盒检测准确度, 结果见表 5。

表 5 保存期效果测试 (n=10)

Table 5 Results of effective date test

添加浓度	阴性	0.5 g/L	2.0 $\mu\text{g/L}$	8.0 $\mu\text{g/L}$
平均值/ $(\mu\text{g/L})$	<0.20	0.60	2.34	8.19
平均回收率/%	-	120.80	117.20	102.30
精密度 CV/%	-	7.30	5.80	9.60

通过测试, 10 份阴性样本未大于 0.20  $\mu\text{g/L}$ , 阳性添加回收准确度最大为 120.80%, 其检测的结果对阴性符合率可靠, 对阳性准确度可靠。

### 3 结论

3.1 为实现胶体金试剂的定量问题, 有些研究者开发出了相应的定量检测仪器, 配合胶体金试剂使用。如张雪梅<sup>[4]</sup>用 U2DOT Read Meter 金标定量检测仪测定  $\beta$ -HCG, 并与 SYM-B10 时间分辨荧光分析仪做比较, 结果二者的一致性很好。但胶体金定量产品还不成熟, 产品质量也参差不齐。要实现准确定量, 产品的均一性与热稳定性必须很好, 否则结果会出现较大误差。

有人将荧光素或荧光微球取代胶体金标记抗原/抗体, 标记方法采用共价偶联方式, 可以使结合物更稳定, 同时提高本底信噪比。刘道峰等<sup>[5]</sup>以荧光微球偶联莱克多巴胺抗体, 制备的复合物粒度均一、性质稳定, 以之为探针建立的荧光微球免疫层析检测方法特异性强、检测范围宽, 检测限为 2.5  $\mu\text{g/L}$ , 高于常见的胶体金试剂的灵敏度。崔浩等<sup>[6]</sup>建立了莱克多巴胺荧光胶乳颗粒免疫层析快速检测技术, 用于检测猪肉中莱克多巴胺残留, 该试纸条的最低检出限可达 0.5  $\mu\text{g/L}$ 。

3.2 本研究对克伦特罗荧光免疫层析定量试剂盒做了初步的性能评价, 结果表明该试剂盒灵敏度高, 结果可靠, 对猪尿的检出限可达 0.26  $\mu\text{g/L}$ , 阳性样本添加回收率为 80~120%。此外交叉反应和稳定性试验结果显示试剂盒特异性和稳定性良好, 具有较好的应用价值。荧光免疫层析法操作很简单, 只需将样本与缓冲液混合后反应 15 min, 即可用荧光定量仪读取结果, 使用方便快捷, 可实现定量检测, 是一种很有应用潜力的方法。

3.3 随着医学检验中 POCT 概念的普及, 食品安全的检测也呈现快速化的趋势, 这将极大地节约人力物力, 也必将加快安全食品在贸易中的过关流通速度。

### 参考文献

- [1] 张群, 刘焯. 固相萃取-反相高效液相色谱法测定鲜肉中盐酸克伦特罗残留量的条件优化[J]. 现代食品科技, 2009, 25(3):337-340
- [2] 中华人民共和国农业部. 动物尿液中盐酸克伦特罗残留检测 气相色谱-质谱法[Z]. 农业部公告 1025 号-16-2008
- [3] 蔡勤仁, 彭玉芬, 冯家望, 等. 超高效液相色谱-电喷雾串联技术测定猪组织中 7 种  $\beta$ -兴奋剂[J]. 现代食品科技, 2009, 25(4):451-454
- [4] 张雪梅. U2DOT Read Meter 金标定量检测仪对  $\beta$ -HCG 检测准确度的探讨[J]. 标记免疫分析与临床, 2011, 18(3):186-188
- [5] 刘道峰, 邓省亮, 赖卫华, 等. 莱克多巴胺荧光微球免疫层析检测方法的建立[J]. 食品与机械, 2012, 28(1):73-77
- [6] 崔浩, 陈耀强, 唐勇, 等. 莱克多巴胺荧光胶乳颗粒免疫层析检测法的建立[J]. 分析测试学报, 2011, 30(7):56-60