

沙丁胺醇药物残留酶联免疫检测法的建立及优化

胡霏¹, 许青华¹, 李文美^{1,2}, 何小维¹

(1. 华南理工大学轻工与食品学院, 广东广州 510640) (2. 广州万孚生物技术有限公司, 广东广州 510663)

摘要: 本试验通过优化 ELISA 工作条件, 建立间接竞争 ELISA 检测沙丁胺醇 (SAL) 的方法。采用方阵滴定法确定包被抗原、抗体、酶标二抗的工作浓度; 以上述试验条件为基础, 以系列稀释的 SAL 标准溶液作为检测对象, 绘制标准曲线, 并最终确定优化的试验方案。方阵滴定法确定包被抗原工作浓度为 1:2000, 抗体工作浓度为 1:4000, 酶标二抗工作浓度为 1:6000; 从标准曲线可知, 线性检测范围为 0.5~20 ng/mL, IC_{50} 为 2.33 ng/mL; 最终优化的试验方案中酶标板为深圳金灿华有限公司的产品, 包被液为 0.05 mol/L pH 9.6 的碳酸盐缓冲液, 封闭液为 1% BSA+PBST, 标准品用复溶液配制, 抗体稀释液为 1 号, 酶标二抗稀释液为 3 号, 显色时间为 15 min。本研究建立了一种灵敏、特异、操作简单、适于大批量样品筛选的 SAL 检测方法, 对其他药物残留免疫学快速检测产品的研制及应用也有一定的借鉴意义。

关键词: 沙丁胺醇; 方阵滴定法; 间接竞争 ELISA

文章编号: 1673-9078(2013)1-201-206

The Establishment and Optimization of Enzyme-linked Immunoassay Method for detection of Salbutamol Residue

HU Fei¹, XU Qing-hua¹, LI Wen-mei^{1,2}, HE Xiao-wei¹

(1. College of Light Industry and Food Sciences, South China University of Technology, Guangzhou 510640 China)

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

Abstract: By optimizing the ELISA working conditions, an indirect competitive ELISA method was established for detection of salbutamol (SAL). The most suitable working condition of ELISA was obtained by phalanx titration method which is used to calculate the most optimal dilution of the coating antigen, antiserum, and HRP secondary antibody. Serial diluted SAL of the standard solution was set as the detection object and the standard curve of ELISA was plotted. The most optimal dilution of the coating antigen, antiserum, and HRP secondary antibody were 1:2000, 1:4000 and 1:6000, respectively. The standard curve of ELISA indicated that the linear determination was 0.5~20 ng/mL with 50% inhibitive concentration (IC_{50}) of 2.33 ng/mL. The ELISA plates produced by Shenzhen Jincanhua Limited was chosen as the the best plate. And the optimization conditions were as follows: envelope liquid 0.05 mol/L, pH 9.6 of carbonate buffer solution and blocking solution 1% BSA + PBST. The standard substance was prepared with combination solution Antibody diluent was of sample 1 and enzyme mark two anti diluents was of sample 3. coloration time was 15 minutes. This method for SAL detection was sensitive, specific, simple operation, suitable for screening large numbers of samples.

Key words: salbutamol; phalanx titration method; icELISA

随着我国畜牧业的迅猛发展, 兽药及其饲料添加剂的日益推广, 保障和促进畜牧业健康发展。但兽药滥用的愈演愈烈及其在动物性食品中的残留已成为消费者健康的一大隐患, 严重可引起中毒甚至死亡^[1]。同时这些残留药物也会对环境产生污染, 引起耐药菌株的出现^[2]。

β -兴奋剂 (β -agonists) 是一组选择性 β_2 -肾上腺受体激动剂, 因能与动物肌内大多数组织细胞膜上的 β 受体结合而得名^[3]。一系列动物试验表明, 如果该类兴奋剂使用达到一定剂量, 这类药物可以使多种动物 (牛、

猪、羊、家禽) 体内的营养成分由脂肪组织向肌肉组织转移, 称为“营养再分配效应”^[4]。 β -兴奋剂的这种营养再分配作用, 使动物体内脂肪代谢增强, 蛋白质合成增加, 可以明显提高胴体瘦肉率及饲料利用率^[5,6]。近来, 国家对滥用“瘦肉精”行为的打击力度加大, 瘦肉精克伦特罗的非法应用得到了有效的制止。所以同样具有促进生长和兴奋剂功能的沙丁胺醇, 成为了继克伦特罗之后营养再分配剂的首选品。但由于其检测手段研究的相对滞后, 逐步成为不法分子谋取经济利益的新手段。因此建立一种灵敏、特异性强、操作简单、适于大批量样品筛选的检测方法, 以完善沙丁胺醇的

收稿日期: 2012-08-17

检测手段是刻不容缓的。

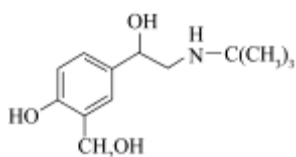


图1 沙丁胺醇结构式

Fig.1 The configuration of salbutamol

沙丁胺醇 (Salbutamol, SAL), 又名舒喘宁、索布胺、阿布叔醇等, 是一种苯酚胺类 β -肾上腺素兴奋剂^[7]。化学名为 4-羟基-5-羟甲基- α -(叔丁胺) 甲基苯乙醇胺, 分子式为 $C_{13}H_{21}NO_3$, 分子量为 239, 结构式如图 1。常用其硫酸盐, 为白色或类白色的粉末, 无臭味, 微苦, 在水中易溶, 能溶于甲醇, 在乙醇中极微溶解、乙醚或三氯甲烷几乎不溶^[8]。

目前对 SAL 残留的检测方法有高效液相色谱法 (HPLC)、气相色谱-质谱法 (GC-MS)、液相色谱-质谱法 (LC-MS)、胶体金免疫层析法以及酶联免疫吸附法 (ELISA) 等。前三种方法准确稳定可靠, 可作为标准方法, 但样品前处理繁琐, 对仪器设备以及操作过程的要求较高, 不适于生产、基层单位及现场检测。ELISA 检测方法则克服了以上的缺点, 是一种快速、灵敏、方便且易普及的检测方法。其中, 孙海新等^[9]人用自主制备的沙丁胺醇特异性抗体建立了针对沙丁胺醇残留的间接竞争酶联免疫检测方法。

食源性致病菌检测对于食品安全非常重要, 致病菌与非致病菌所造成的污染是有效监测食源性致病菌的关键环节^[10]。本研究旨在 SAL 的 ELISA 检测方法的建立与优化, 探索最优化的条件, 掌握沙丁胺醇等半抗原的免疫检测关键技术, 研制出检测限低, 准确度高的沙丁胺醇试剂盒产品。检测动物性食品中沙丁胺醇残留, 有效的整治 SAL 的非法使用, 保障动物性食品的食用安全。以 SAL 为研究对象, 其原理、技术和方法对其他药物残留免疫学快速检测产品的研制及应用也有一定的借鉴意义。

1 材料与方法

1.1 试剂和仪器

仪器: 酶标仪、洗板机、精密电子天平、TGL20M 型台式高速冷冻离心机、GL-3250C 型磁力搅拌器、DHG-9240A 型电热恒温鼓风干燥箱、氮气吹干仪、(JET、NUNES、Costar、金灿华) 四种 96 孔 (8×12) 可拆酶标板、微量移液器。

试剂: 沙丁胺醇标准品、过氧化氢、3,3',5,5'-四甲基联苯胺 (TMB)、酶标二抗、卵清白蛋白 (OVA)、牛血清白蛋白 (BSA)、酪蛋白、脱脂奶粉、复溶液 (万

孚生物技术有限公司提供); (1、2、3、4 号) 抗体稀释液 (万孚生物技术有限公司提供); 磷酸二氢钠、磷酸氢二钠、氯化钠、异丁醇、盐酸、硫酸、氢氧化钠。

1.2 试验方法

1.2.1 工作浓度的确定

抗原包被浓度、抗体工作浓度和酶标二抗使用浓度的初步选择。通过方阵滴定法^[11], 确定各最佳的工作浓度。

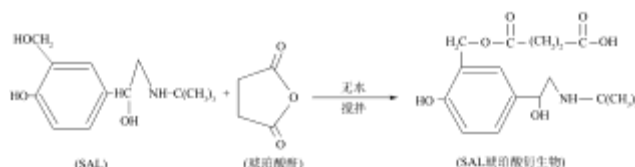


图2 SAL 衍生物 Hapten A 的路线图

Fig.2 Synthesis scheme of derivative Hapten A

准确称取 2 mg Hapten A, 溶于 3 mL PB (磷酸缓冲液, 0.1 N pH 8.0) 和 200 μ L N,N-二甲基甲酰胺 (DMF) 中, 冰浴中加入 5 μ L 三乙胺和 5 μ L 氯甲酸异丁酯, 4 $^{\circ}$ C 搅拌反应 0.5 h, 此为反应液 A。另称取 50 mg BSA 溶于 1 mL PB 中, 放入冰箱中预冷, 此为反应液 B。将反应液 A 缓慢滴加到反应液 B 中, 室温下继续搅拌 3.5 h。反应结束后, 将反应物置于经预处理过的透析袋内, 用 1×PBS (0.01 mol/L, pH 7.4 的磷酸盐缓冲液) 在 4 $^{\circ}$ C 下透析 72 h, 每 8 h 换一次透析液。即成包被原 Hapten A-BSA^[12]。

选用 Hapten A-BSA 作偶联抗原。

将包被用偶联抗原用包被缓冲液分别按 1:500、1:1000、1:2000、1:4000 稀释, 横向加入各孔, 每个浓度两列, 100 μ L/孔, 4 $^{\circ}$ C 过夜; 用 1×PBST (0.05%、pH 7.4 的磷酸盐吐温缓冲液) 洗板 5 次, 150 μ L/孔, 37 $^{\circ}$ C 封闭 1 h, 封闭完毕后洗板, 在吸水纸上拍干, 晾干待用; 抗体分别稀释 1:1000、1:2000、1:4000 和 1:8000, 各孔加入 50 μ L 浓度为 0 ng/mL 和 20 ng/mL 的 SAL 标准品, 再纵向加入 50 μ L 各稀释度的抗体溶液, 37 $^{\circ}$ C 温育 30 min; 酶标二抗 (HRP-IgG, 辣根过氧化物酶-免疫球蛋白 G) 分别稀释 4000 和 6000 倍, 洗涤后每孔加入不同稀释度的二抗, 100 μ L/孔, 37 $^{\circ}$ C 恒温箱中温育 30 min, 洗板后加入显色液显色; 每孔加入终止液 (2 mol/L 硫酸) 50 μ L, 轻轻振荡混匀, 并设定酶标仪于 450 nm 处, 测定 0 ng/mL 和 20 ng/mL 的 SAL 标准品吸光度值。

1.2.2 icELISA 标准曲线的制作

根据方阵法所选择的各最佳浓度进行间接竞争 ELISA 测定, 制作标准曲线。

以最佳包被浓度对包被原稀释并包被, 100 μ L/孔, 4 $^{\circ}$ C 冰箱保存过夜, 用 PBST 洗板 5 次, 150 μ L/

孔, 37 °C 封闭 1 h, 封闭完毕后洗板, 在吸水纸上拍干, 晾干待用; 分别加 10 个浓度 (0 ng/mL、0.1 ng/mL、0.2 ng/mL、0.5 ng/mL、1 ng/mL、2 ng/mL、4 ng/mL、8 ng/mL、10 ng/mL、20 ng/mL、30 ng/mL) 的 SAL 标准溶液, 以最佳稀释度稀释抗体, 50 μL/孔、37 °C 温育 30 min; 洗涤后, 加入 1:6000 稀释的二抗, 100 μL/孔, 37 °C 温育 30 min, 洗涤后拍干; 加入显色液, 100 μL/孔, 37 °C 反应 15 min; 加终止液, 5 μL/孔, 酶标仪上测定吸光度; 求出各浓度的 B/B₀ 值 (B: 标准溶液或样本溶液的平均吸光度值, B₀: 0 ng/mL 标准溶液的平均吸光度值)。

以沙丁胺醇标准品浓度 (ng/mL) 的半对数为横坐标、B/B₀ 为纵坐标作图, 得 SAL 的 icELISA 标准曲线。

1.2.3 icELISA 方法的优化

1.2.3.1 酶标板的选择

选取四种酶标板各两条, 按照 ELISA 操作方法, 将每种酶标板各加入一条 0 ng/mL 和 5 ng/mL 的标准品, 测定其吸光度值, 考察 A_{max} 和板内均一性, 确定最佳酶标板。

1.2.3.2 包被液的优化

一般的包被液有 CBS (0.05 mol/L、pH 9.6 的碳酸盐缓冲液)、10×PBS (0.02 mol/L、pH 7.4 的碳酸盐缓冲液) 和 Tris-HCl 缓冲液 (1 mol/L、pH 8.0)。本试验对这三种包被液分别进行试验, 考察其对 A_{max} 和变异系数的影响, 确定最佳包被液。

1.2.3.3 封闭液的优化

一般的封闭液有 OVA、BSA、酪蛋白及脱脂奶粉。但是免疫中已使用 OVA, 故试验中分别采用 1% 的 BSA、1% 的酪蛋白以及 1% 的脱脂奶粉作为封闭液,

其余均按 icELISA 操作方法进行, 比较 0 ng/mL 和 5 ng/mL (即阴/阳性孔) 的吸光值, 计算阴性/阳性 OD_{450nm} (OD 值, 即光密度) 比值, 确定最佳封闭液。

1.2.3.4 标准品稀释液的优化

将偶联抗原包被酶标板, 洗板、封闭后分别加入用复溶液、PBS 和水配制的 SAL 系列标准液和抗体溶液, 温育、洗涤, 再分别加入二抗, 再次温育、洗涤、显色后测定吸光度, 考察标准品稀释液对 A_{max} 以及 IC₅₀ (IC₅₀, 50% 抑制浓度, 是评价小分子物质免疫吸附测定最主要的指标。IC₅₀ 值越低, 检测极限越好; IC₅₀ 值越高, 检测极限越差^[3]) 的影响, 确定最佳标准品稀释液。

1.2.3.5 抗体稀释液的优化

将偶联抗原包被酶标板, 洗板、封闭后分别加入 SAL 标准液和用 1 号、2 号、PBST 稀释抗体溶液, 温育、洗涤, 再分别加入二抗, 再次温育、洗涤、显色后测定吸光度, 并考察抗体稀释液对 A_{max} 以及 IC₅₀ 的影响, 确定最佳抗体稀释液。

1.2.3.6 酶标二抗稀释液的优化

将偶联抗原包被酶标板, 洗板、封闭后加入 SAL 标准液和抗体溶液, 温育、洗涤, 再分别加入用 3 号、4 号和 PBST 稀释到工作浓度的二抗, 再次温育、洗涤、显色后测定吸光度, 考察酶标二抗稀释液对 A_{max} 以及 IC₅₀ 的影响, 确定最佳二抗稀释液。

1.2.3.7 显色液显色时间的优化

将偶联抗原包被酶标板, 洗板、封闭后加入 SAL 标准液和抗体溶液, 温育、洗涤, 再加入二抗, 再次温育、洗涤, 分别显色 5 min、10 min、15 min 和 25 min, 测定吸光度, 考察显色时间对 A_{max} 以及 IC₅₀ 的影响, 确定最佳显色时间。

表 1 方阵滴定法确定工作浓度

Table 1 The determination of working concentration by matrix titration method

抗体	包被抗原								
	1:500		1:2000		1:4000		1:8000		
1:1000	0ng/mL	3.054	2.421	2.672	1.588	2.651	1.543	1.705	0.773
	20ng/mL	1.298	0.753	0.736	0.344	0.707	0.330	0.506	0.168
1:2000	0ng/mL	2.873	1.825	2.343	1.031	2.064	1.223	1.113	0.673
	20ng/mL	1.124	0.234	0.869	0.226	0.542	0.286	0.280	0.179
1:4000	0ng/mL	2.714	1.657	1.982	0.938	1.851	0.808	0.862	0.378
	20ng/mL	0.735	0.365	0.188	0.153	0.398	0.182	0.164	0.098
1:8000	0ng/mL	1.720	1.003	0.934	0.506	1.007	0.479	0.500	0.207
	20ng/mL	0.467	0.185	0.179	0.097	0.191	0.100	0.105	0.065
酶标二抗稀释倍数		6000	8000	6000	8000	6000	8000	6000	8000

2 结果与讨论

2.1 工作浓度的确定

按照方阵滴定法, 将包被用偶联抗原用包被缓冲液分别按 1:500, 1:2000, 1:4000, 1:8000 稀释, 抗体分别按 1:1000、1:2000、1:4000 和 1:8000 稀释, 二抗分别稀释 6000 和 8000 倍, 测定 0 ng/mL 和 20 ng/mL 的 SAL 标准品在 450 nm 处的吸光度值, 结果见表 1。

依据试验室经验, 为了后续绘制标准曲线时, 曲线梯度分得较大, 线性关系良好, 0 ng/mL 的标准液的 OD 值应在 1.6~2.2 之间, 最高浓度标准液 (20 ng/mL) 的 OD 值应在 0.1~0.3 之间。

由表 1 可知, 在包被液稀释倍数 1:2000、抗血清稀释倍数 1:4000、二抗稀释倍数 1:6000 时, 阴性标准液和浓度为 20 ng/mL 的标准液的 OD 值分别为 1.982 和 0.188; 在包被液稀释倍数 1:500、抗血清稀释倍数 1:2000、二抗稀释倍数 1:8000 时, 阴性标准液和浓度为 20 ng/mL 的标准液的 OD 值分别为 1.825 和 0.234。再综合节约材料的原则, 选择包被液稀释倍数 1:2000, 抗血清稀释倍数 1:4000, 二抗稀释倍数 1:6000 作为工作浓度。

2.2 竞争标准曲线的制作

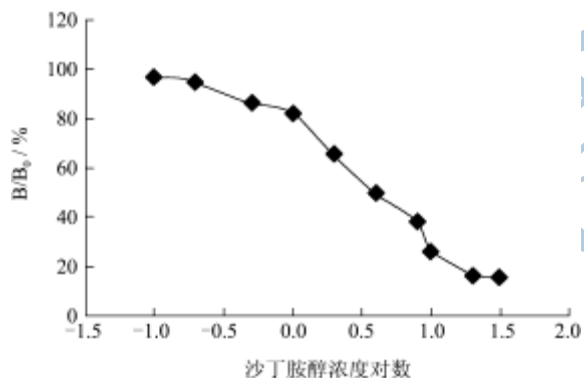


图3 竞争 ELISA 标准曲线点的确定

Fig.3 Definition of icELISA standard curve point

对于呈 S 型的标准曲线, 尽量要使试验样品的浓度在中间坡度最陡段, 即曲线几乎成直线的范围内^[14]。通过绘制散点图(图 3), 选择标准曲线的点为 0 ng/mL, 0.5 ng/mL, 2 ng/mL, 4 ng/mL, 10 ng/mL, 20 ng/mL, 以此六个点作标准曲线图来进行验证。

图 4 可以看出, 所绘标准曲线线性好, 各点与理论值的偏离小, 因此最终曲线采用的标准点浓度为 0 ng/mL、0.5 ng/mL、2 ng/mL、4 ng/mL、10 ng/mL、20 ng/mL。史利军等^[5]人所建立的免疫学方法的 IC₅₀ 为 40.5ng/mL, 而计算得 IC₅₀ 为 3.58ng/mL, 较同类试剂盒灵敏度低, 故还需要进行优化。

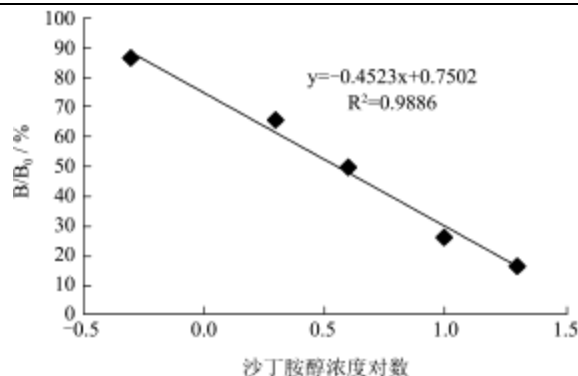


图4 竞争 ELISA 标准曲线

Fig.4 The standard curve of icELISA

2.3 icELISA 方法的优化

2.3.1 酶标板的选择

专用于 ELISA 测定的产品称为酶标板, 国际通用的标准板形是 8×12 的 96 孔式。良好的 ELISA 酶标板应该是吸附性能好、空白值低、孔底透明度高、各板之间和同一板各孔之间性能相近的。

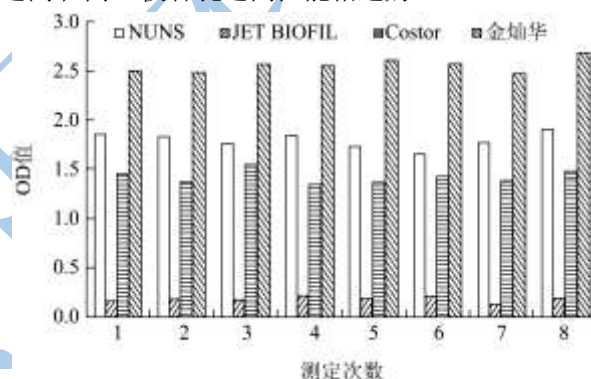


图5 酶标板的优化

Fig.5 The optimization of ELISA plate

酶标板在 0 ng/mL 时 OD 值大小可以说明板的吸附性能, OD 值越大, 则吸附性能越好。由上图可知, 金灿华酶标板的 A_{max} 值最大, 吸附性能最好, 且变异系数最小, 酶标板的均一性较好。从价格来说, 前三种酶标板均为进口, 价格较贵。故选择金灿华酶标板。

2.3.2 包被液的优化

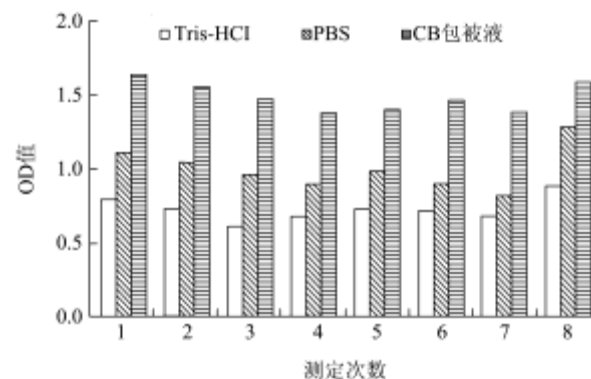


图6 包被溶液的优化 (N=8)

Fig.6 The optimization of coating buffer

实验考察了三种常用包被液(Tris-HCl、10×PBS 溶液以及 CBS 溶液)对最大吸光度和变异系数的影响。可见, A_{max} 随着 Tris-HCl, 10×PBS 溶液, CBS 溶液的顺序依次增大, 即包被效率依次增大, 且每次包被的 OD 值的变异系数分别为 11.40%、14.66%、6.60%, 即 CBS 溶液的重现性和稳定性最好, 因此选择 CBS 溶液为最佳包被缓冲液。

2.3.3 封闭液的优化

在间接法中, 封闭一般是不可少的。因为后续与抗体结合的过程中, 抗体蛋白易特异吸附于固相载体表面。

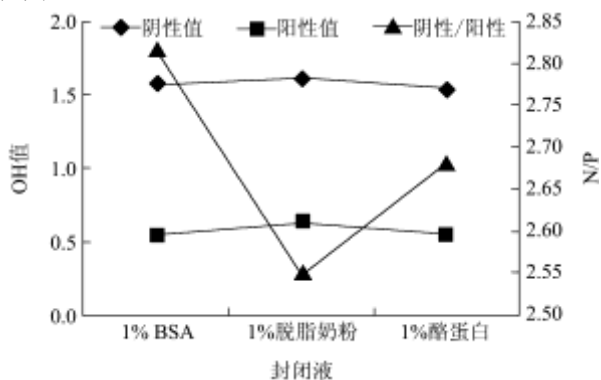


图7 封闭液的优化

Fig.7 The optimization of blocking buffer

图7是1% BSA、1%脱脂奶粉、1%酪蛋白分别作为封闭液的检测参数对比。可知, 封闭液为1% BSA时, 阴性/阳性 OD_{450nm} 值最大, 封闭效果最好。另外, 试验中脱脂奶粉、酪蛋白较难溶解, BSA 容易溶解。综上, 决定选用1% BSA作为封闭液。

2.3.4 标准品稀释液的优化

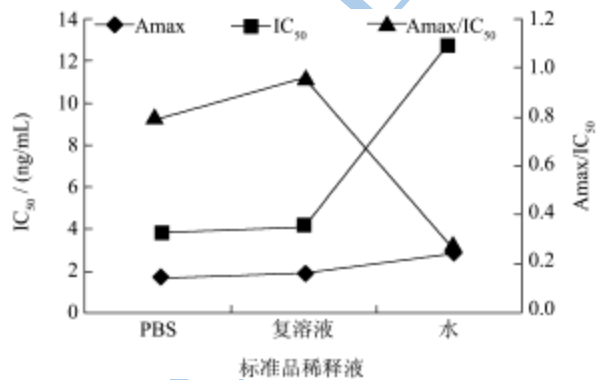


图8 标准品稀释液的优化

Fig.8 The optimization of standard solution dilution buffer

图8是用PBS、复溶液和水配制标准品时的参数对比, 可以看出, 用复溶液配制标准品时的 A_{max} 和 A_{max}/IC_{50} 最大, 故选择复溶液配制的标准品稀释液。

2.3.5 抗体稀释液的优化

抗体是蛋白质, 具有疏水性, 因此, 抗体蛋白与组织中的蛋白可以出现不同程度的交联, 产生染色背

景。抗体稀释液可以影响到抗体与组织蛋白的疏水性, 抗体稀释液 pH 越接近抗体的等电点, 疏水性越强。

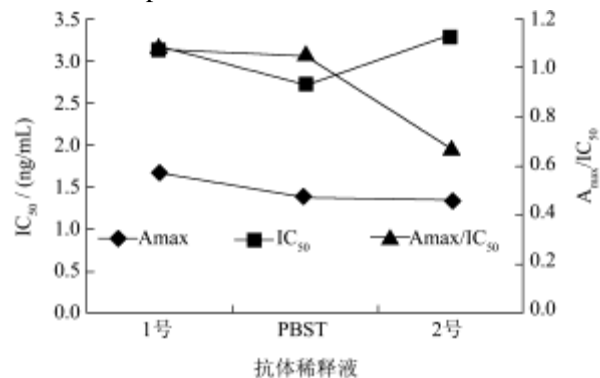


图9 抗体稀释液的优化

Fig.9 The optimization of antibody dilution buffer

图9是1号、2号、PBST的抗体稀释液的检测参数对比, 1号抗体稀释液的 A_{max} 和 A_{max}/IC_{50} 最大, 故选择1号抗体稀释液。

2.3.6 酶标二抗稀释液的优化

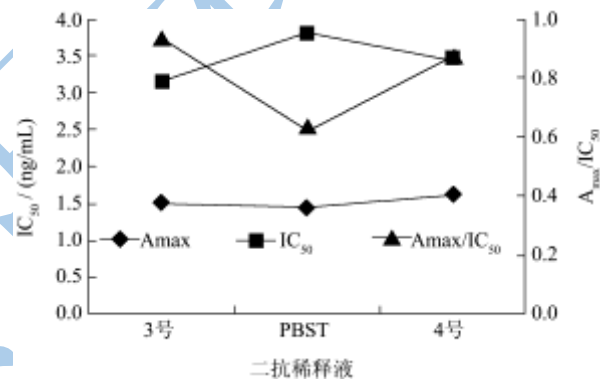


图10 二抗稀释液的优化

Fig.10 The optimization of secondary antibody dilution buffer

图10实验结果可以看出, 3号二抗稀释液的 A_{max} 和 A_{max}/IC_{50} 最大, 即实验条件最优。故选择3号作为二抗稀释液。

2.3.7 显色液显色时间的优化

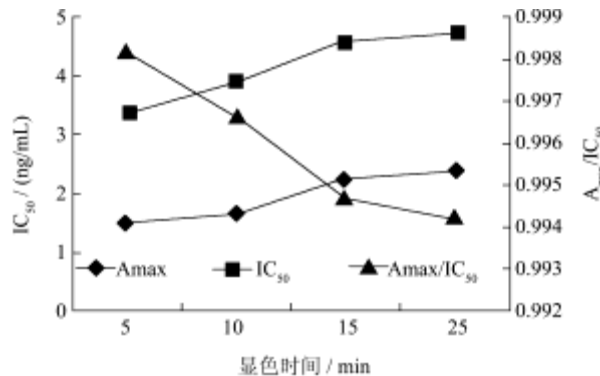


图11 显色时间的优化

Fig.11 Optimization of coloration time

图11是显色时间分别为5 min、10 min、15 min和25 min的ELISA结果。显色时间越短, 吸光度值

越低, 曲线的 IC_{50} 值也越小, 但是吸光值过低会在测定过程中带来较大测量误差, 因此选择 15 min 为最佳显色时间。

3 结论

3.1 ELISA 反应体系是在溶液中进行的, 因此, 包被抗原浓度、抗体浓度、酶标物浓度的确定至关重要。

只有三个浓度都达到最佳值, 才能测出 IC_{50} 值, 制作出最佳的标准曲线, 否则, 即使有特异性很好的抗体也可能得不出竞争曲线。通过方阵滴定法, 选择包被液稀释倍数 1:2000, 抗血清稀释倍数 1:4000, 二抗稀释倍数 1:6000 作为工作浓度。

3.2 icELISA 标准曲线的制作中, 一般样品的浓度要在预期标准曲线测定范围内选择多个浓度水平, 然后依据试验结果逐渐减少数据点直至表现出线性关系, 通常应控制相关系数 $R^2 \geq 0.98$ 。本试验选择 icELISA 标准曲线的点为 0 ng/mL, 0.5 ng/mL, 2 ng/mL, 4 ng/mL, 10 ng/mL, 20 ng/mL, 以此六个点作标准曲, 相关系数为 0.9886, IC_{50} 等于 3.58 ng/mL。

3.3 在建立了 icELISA 的方法后, 通过对各项实验条件的优化, 最终确定的 icELISA 对 SAL 检测的各项实验条件是, 酶标板为深圳金灿华有限公司的产品, 包被液为 0.05 mol/L pH 9.6 的 CBS, 封闭液为 1% BSA+PBST, 标准品用复溶液配制, 抗体稀释液为 1 号, 酶标二抗稀释液为 3 号, 显色时间为 15 分钟。

3.4 因研究时间有限, 在本试验过程中仍然有许多问题还未很好地解决, 需要在后续的研究工作中进一步改进: 一是采用红外光谱、核磁共振等仪器法对沙丁胺醇衍生物进行表征, 对其结构有更好的认识; 二是可以制备单克隆抗体, 提高试剂盒的灵敏度。

参考文献

- [1] 陈一资, 胡滨. 动物性食品中兽药残留的危害及其原因分析[J]. 食品与生物技术学报, 2009, 28(2): 162-166
- [2] 田颖, 李玉文. 兽药残留及其分析技术研究进展[J]. 现代畜牧兽医, 2005, 35(12): 42-43

- [3] 汪慧蓉. β -兴奋剂克伦特罗沙、丁胺醇的免疫检测方法研究[D]. 西安: 西北大学生命科学学院, 2006
- [4] 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 β -兴奋剂[J]. 现代食品科技, 2009, 25(4): 451-454
- [5] Baker Pk, Ja Kiernan. Phenylethanolamine derivatives and acid addition salts thereof for enhancing the growth rate of meat-producing animals and improving the efficiency of feed utilization thereby [J]. *Fbod&Agriculture Immunology*, 1999, 6(3): 241-249
- [6] Baker Pamela K, D L Ingle, et al. Use of a beta-Adrenergic Agonist to Alter Muscle and Fat Deposition in Lambs [J]. *J. Anim Sci*, 1994, 59(5): 1256-1261
- [7] Regueiro J A G, Perez B, Casademont G. Determination of clenbuterol and salbutamol in urine by capillary gas chromatography with capillary columns of 100 μ m [J]. *Chromatogr*, 2003, 65(5): 73-76
- [8] 刘宣兵, 庞玉芳, 侯玉泽, 等. 沙丁胺醇的毒副作用及其残留检测[J]. 上海畜牧兽医通讯, 2008, 26(4): 83-85
- [9] 孙海新, 凌红丽, 王雷, 等. 沙丁胺醇残留的酶联免疫检测方法的建立[J]. 中国动物检疫, 2009, 6(12): 44-47
- [10] 李聪聪, 余以刚, 邱杨, 等. PMA-qPCR方法用于监测超声波灭菌效率的适用性及其应用[J]. 现代食品科技, 2012, 28(4): 409-423
- [11] 朱立平, 陈学清. 免疫学常用试验方法[M]. 北京: 人民军医出版社, 2000
- [12] Manisha S, R. Ghopade, et al. Direct hapten-linked competitive inhibition enzyme-linked immunosorbent assay (CIELISA) for the detection of O-pinacoyl methyl-phosphonic acid [J]. *Analyst*, 2012, 137(2): 406-413
- [13] 叶道成. 免疫分析技术在出口猪兽药残留检测中的应用[D]. 杭州: 浙江大学生命科学院, 2006
- [14] 武中平, 徐春祥, 高巍, 等. 酶联免疫分析法及其在食品农药残留检测中的应用[J]. 江苏农业科学, 2007, 35(3): 198-201
- [15] 史利军, 杨正涛, 王艳, 等. 沙丁胺醇单克隆抗体的制备及其免疫学检测方法的建立[J]. 中国兽医杂志, 2006, 42(6): 12-14

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