核酸适配体-纳米金可视化检测盐酸克伦特罗

张娜¹, 韦丽婷², 李向丽¹, 刘妍¹, 谭贵良^{3,4}, 王周平², 郭艳峰¹

(1.中山火炬职业技术学院生物医药系,广东中山 528436)(2.江南大学食品学院,江苏无锡 214122)
 (3.电子科技大学中山学院,广东中山 528402)(4.中山市食品药品检验所,广东中山 528437)

摘要:建立了一种基于核酸适配体识别-纳米金显色的盐酸克伦特罗可视化检测方法。通过合成纳米金、适配体、适配体互补链 以及适配体-纳米金探针和互补链-纳米金探针,利用纳米金的变色效应,构建了盐酸克伦特罗的简单、快速、高灵敏度检测方法。当 待测物中含有目标物时,适配体与目标物结合,纳米金呈现游离状态,在一定的盐浓度下,纳米颗粒发生聚集,纳米金颜色发生变化; 当待测物中不含目标物时,适配体与适配体互补链互补杂交,形成稳定的网络结构,溶液颜色不发生变化。分别对适配体、互补链与 纳米金连接的陈化盐浓度、适配体与互补链浓度、显色体系盐浓度等参数进行了优化。在优化的条件下,盐酸克伦特罗在1~1000 ng/mL 浓度范围内,呈现良好的线性关系,回归方程为 y=0.023 x+0.362 (R²=0.991),最低检测限为1 ng/mL。对猪肝实际样品的加标回收 率为 83.5%~101.8%。该方法简单、准确、可靠,可用于实际样品的检测分析。

关键词:盐酸克伦特罗;适配体;纳米金;可视化 文章篇号:1673-9078(2019)07-301-306

DOI: 10.13982/j.mfst.1673-9078.2019.7.043

A New Method for the Determination of Clenbuterol Based on Aptamer

and Gold Nanoparticles

ZHANG Na¹, WEI Li-ting², LI Xiang-li¹, LIU Yan¹, TAN Gui-liang^{3,4}, WANG Zhou-ping², GUO Yan-feng¹

(1.Department of Biomedicine, Zhongshan Torch Polytechnic, Zhongshan 528436, China)(2.Food College Jiangnan University, Wuxi 214122, China)(3.Zhongshan College, University Electronic Science Technology of China, Zhongshan 528402, China) (4.Zhongshan Institute for Food and Drug Control, Zhongshan 528437, China)

Abstract: To detect clenbuterol (CL), a β -Agonist,a visual and rapid method based on aptamer and gold nanoparticles (AuNPs) was established in this study. The aptamer (DNA1) conjugating with clenbuterol, and its complementary DNA (DNA2) were designed and synthetized, respectively. The aptamer-AuNPs probe (probe1) and aptamer complementary DNA-AuNPs probe (probe2) were also synthetized in present study. In the presence of CL, aptamer bound to the target, AuNPs maintained a free state, however, these AuNPs began to aggregate and change color from red to purple in a high concentration of salt. In the absence of CL, aptamer and its complementary DNA formed a stable network, keeping red color. Some parameters, such as the concentration of aptamer, aptamer complementary DNA and salt were optimized, respectively. The results showed that in the optimum conditions, clenbuterol had a good linear relationship ranging from 1 to 1000 ng/mL, with correlation coefficients (R²) 0.991. The visual detection limit was 1 ng/g, and the recoveries at three spike levels ranged from 83.5% to 101.8%. This newly developed method was simple, sensitive, and reliable. It was suitable to detect clenbuterol in actual samples.

Key words: clenbuterol; aptamer; gold nanoparticles; colorimetric

盐酸克伦特罗,俗称瘦肉精,是一种 β2-受体激 动剂,用于治疗动物咳嗽的平喘药物,为白色或类似 白色的结晶体粉末,化学性质稳定。由于其易被动物 收稿日期: 2019-03-08

收稿日期: 2019-03-08

基金项目:广东省食药局科技计划项目(2015ZX07);中山市科技计划项目 (2015B2353)

作者简介:张娜(1984-),女,讲师,研究方向:食品药品质量检测 通讯作者:李向丽(1979-),女,博士,教授,研究方向:食品质量检测 与食品安全;共同通讯作者:谭贵良(1977-),男,博士,教授级高工, 研究方向:食品检测分析技术 吸收,可促进动物生长,能改善动物体内脂肪分配, 盐酸克伦特罗被非法添加到动物饲料中,以增加瘦肉 率。但这种药物在动物体内残留时间长,容易在动物 的肝脏、肾脏、肌肉等组织中引起蓄积。人食用残留 有克伦特罗的畜禽产品后会引起食物性中毒,中毒症 状往往表现为心跳过快、四肢肌肉颤动、头痛眩晕等 中毒症状。自上世纪 80 年代以来,国内外已多次发生 食用残留克伦特罗药物食品中毒的事件。目前,盐酸 克伦特罗等 β2-受体激动剂与甾体激素被并列为对健 康威胁最严重的同化激素。为保证食品安全,2002 年 2 月农业部、卫生部、国家药品监督管理局发布《禁 止在饲料和动物饮用水中使用的药物品种目录》(农业 部公告第 176 号),将盐酸克仑特罗等 7 种肾上腺素受 体激动剂列为禁用药品,禁止其在饲料和动物饮用水 中使用。接着在 2002 年 12 的中华人民共和国农业部 第 235 号公告明确规定,在所有动物的所有可食品组 织中不得检出克伦特罗及其盐、酯。因此,做好盐酸 克伦特罗的分析检测工作,对保护人体健康具有重要 意义。

目前,已经有多种技术可以对盐酸克伦特罗进行 检测,包括气相色谱-质谱联用(GC-MS)^[1,2]、高效液相 色谱(HPLC)^[3]、液相色谱-串联质谱技术 (LC-MS/MS)^[4-7]、酶联免疫法^[8~10]、免疫胶体法^[11,12]、 毛细管电泳法(CE)^[13]、芯片法^[14]等。尽管这些方法有 很高的选择性和灵敏度,但是其中一些方法需要昂贵 的仪器设备(如色谱法、质谱法、毛细管电泳法)、检 测成本较高或者需要长时间的样品预处理过程,且无 法满足现场检测和快速筛查的要求。因此建立一种低 成本、操作简单、灵敏、快速的克伦特罗检测技术显 得尤为必要。

核酸适配体是一段 DNA 序列。1990 年, Ellington 和 Szostak^[15]以及 Tuerk 和 Gold^[16]用 SELEX(指数富 集的配体系统进化)技术分别筛选出能与有机染料和 T4 DNA 聚合酶特异性结合的随机寡核苷酸,并由 Ellington 和 Szostak 命名为核酸适配体(aptamer)。从核 酸分子文库中得到的寡核苷酸片段,是一类新型识别 分子,具有亲和力高、特异性强、分子量小、可化学 合成、稳定性好、无毒性等优点。本研究基于核酸适 配体的高特异性、灵敏性识别,结合纳米金的独特光 学特性,建立了盐酸克仑特罗的快速可视化方法,为 有效解决食品中盐酸克伦特罗的快速检测提供技术支 持。

1 材料与方法

1.1 主要仪器

AR224CN 电子天平、Starter 3C 实验室 pH 计, 奥豪斯仪器有限公司; JEM-2100HR 透射电子显微镜, JEOL 公司, 日本; Centrifuge 5424R 台式高速冷冻离 心机, Eppendorf 中国有限公司; ND-1000 微量紫外可 见分光光度计,美国 Nanodrop 公司; Synergy H1 全 功能微孔板检测仪酶标仪,美国伯腾; F-7000 全波长 荧光光谱仪,日本日立公司。

1.2 试剂与样品

盐酸克伦特罗标准品购自 Sigma-Aldrich 公司; 氯 金酸(纯度 99%)、柠檬酸三钠、氯化钠、氯化钾、 磷酸氢二钠,磷酸二氢钠等购自医药上海化学试剂公 司(均为分析纯);盐酸克仑特罗适配体 DNA1:5'SH-AGC AGC ACA GAG GTC AGA TGT CAT CTG AAG TGA ATG AAG GTA AAC ATT ATT TCA TTA ACA CCT ATG CGT GCT ACC GTG AA-3'。盐酸克仑特罗 适配体的互补链 DNA2:5'-TTC ACG GTA GCA CGC ATA GGT GTT AAT GAA ATA ATG TTT A-SH-3'由生 工生物工程(上海)有限公司(中国)合成。

1.3 纳米金的制备

首先将所用容器用王水浸泡约8h,然后用超纯水 清洗浸泡好的容器并烘干。在烘干后的三口圆底烧瓶 中加入体积比为20:1的超纯水和0.2%氯金酸溶液, 在油浴锅中边搅拌边加热至沸腾,10min后加入1% 柠檬酸钠(含0.03%柠檬酸),柠檬酸钠与氯金酸的体 积比为4:5,继续加热10~15min至溶液变成清亮透明 的酒红色,停止加热,继续搅拌15~20min,再冷却 至室温,即得到粒径为15±2nm的纳米金颗粒。将此 溶液置于棕色瓶中,于4℃避光保存,通过紫外-可 见吸收光谱和透射电子显微镜(TEM)进行表征。

1.4 适配体-纳米金探针和互补链-纳米金探针

的制备

将巯基化适配体 DNA1 和互补链 DNA2 分别与 TCEP 混合活化, DNA1、DNA2 与 TCEP 的摩尔比为 1:100; 将纳米金溶液在4 ℃, 12000 r/min 的条件先 离心 30 min, 弃去 3/4 上清液, 再振荡重悬, 得纳米 金浓缩液;随后将活化后的 DNA1 和 DNA2 分别加入 上述的纳米金浓缩液中,活化后的 DNA 与纳米金浓 缩液的体积比为 2:23, 在 37 ℃ 150 r/min 条件下摇床 孵育 12~16 h,将十二烷基硫酸钠(SDS)加入上述 DNA1-纳米金探针和 DNA2-纳米金探针中, SDS 的终 浓度约为0.4%;在12h内分多次加入NaCl溶液进行 陈化,每次加入 NaCl 前先超声 10~15 s,加入后振荡 混合;将以上处理后的 DNA1-纳米金探针和 DNA2-纳米金探针在 37 ℃ 150 r/min 摇床条件下陈化 12 h; 陈化后的 DNA1-纳米金探针和 DNA2-纳米金探针在 25 ℃ 10000 r/min 条件下离心 30 min, 吸出上清液, 再加入等量去离子水,如此重复离心洗涤2次,以去 除未与纳米金结合的 DNA1 和 DNA2, 即得到所述的 适配体-纳米金探针和互补链-纳米金探针,置于4℃ 冰箱中避光保存备用。

1.5 盐酸克伦特罗的检测

将制备好的适配体-纳米金探针和互补链-纳米金 探针置于水浴锅中 95 ℃热处理 5 min,然后取 100 μL 适配体-纳米金探针、200 μL 互补链-纳米金探针、100 μL 不同浓度的盐酸克伦特罗溶液,置于 1.5 mL 离心 管中混匀,在 37 ℃摇床中孵育 1 h,随后加入 21 μL 2 mol/L NaCl 溶液,使 NaCl 终浓度达到 100 mmol/L; 反应 5 min 后,观察溶液颜色变化,并在 200~800 nm 进行 UV-vis 扫描。根据 A₅₄₀ 的吸光值和盐酸克伦特罗 的浓度绘制盐酸克伦特罗的标准曲线。

1.6 数据分析

试验结果以"平均数±标准偏差"表示。采用 Origin 8 软件对数据进行处理并作图。

2 结果与讨论

2.1 可视化检测的原理



图 1 基于适配体-纳米金比色检测盐酸克伦特罗的原理 Fig.1 Principle of the visual detection of Clenbuterol using

aptamer and AuNPs

DNA1 与 DNA2 是互补配对的碱基序列, DNA1 能够识别并捕获靶物质盐酸克伦特罗, 互补链 DNA2 和盐酸克伦特罗竞争与适配体 DNA1 结合。当待测物 中含有盐酸克伦特罗时, DNA1 与盐酸克伦特罗结合, 纳米金呈现游离的状态, 在一定的盐浓度下, 纳米金 表面的负电荷被屏蔽, 纳米颗粒间的排斥力减弱, 发 生聚集现象,由于纳米金的颜色具有光距离依赖特性, 因此纳米金的颜色发生变化, 待测物中盐酸克伦特罗 的浓度不同, 纳米金聚集的程度也不同, 从而导致纳 米金溶液的颜色也不同; 当待测物中没有盐酸克伦特 罗时, DNA1 与 DNA2 互补杂交, 形成稳定的网络结 构, 在一定的盐浓度下, 纳米金粒子间的距离没有被 拉近, 因此纳米金溶液的颜色没有发生变化, 根据纳 米金溶液颜色的变化实现盐酸克伦特罗的可视化检测。检测原理如图1所示。

2.2 纳米金的表征

纳米金,又称胶体金,是指金(Au)的粒径为1~100 nm 之间的粒子,无毒副作用,相容性好。由于其可 以和大分子物质核酸、蛋白质很好的结合,性质稳定, 而被广泛使用。由图2纳米金的紫外-可见吸收图谱可 知,其最大吸收峰出现在520 nm 处。根据 Haiss 和 Thanh 等发表的文献^[17]计算 Aspr/A450,得出纳米金 颗粒直径为15±2 nm,该估算结果与纳米金的透射电 镜图相符合。据文献报道,十几 nm 左右的纳米金适 合作核酸标记物。本实验中制备的纳米金粒径大小均 一、大小适中、形态完好、分散均匀,满足实验所需 要的纳米金粒径要求,可用于适配体及互补链的标记。 **a** 1.0r





2.3 实验条件的优化

2.3.1 陈化盐浓度的优化



Modern Food Science and Technology

2019, Vol.35, No.7





Fig.3 Absorption spectrum of AuNPs conjugated with DNA1 (a)

and DNA2 (b) at different concentration of NaCl



Fig.4 Binding rate of AuNPs conjugated with DNA1 (a) and DNA2 (b) at different concentration of NaCl

率

为了提高适配体、互补链与纳米金的连接率,在 适配体-纳米金探针和互补链-纳米金探针的制备过程 中,需要加入 NaCl 溶液进行陈化,因此对陈化过程 中 NaCl 浓度的优化是一个重要的步骤。巯基修饰的 适配体 DNA1 和互补链 DNA2 可以通过 S-Au 键的共 价结合到纳米金的表面,在制备适配体-纳米金探针和 互补链-纳米金探针的过程中,加入 NaCl 溶液进行陈 化,可有效地屏蔽寡核苷酸和纳米金之间的电荷排斥 ^[18],以利于 Au-S 键的形成,因此体系中 NaCl 的浓度 对实验有重要的影响。在一定的范围内, NaCl 的浓度

越高,结合到纳米金表面的寡核苷酸的量也会增加, 因此纳米金和 DNA 的结合率就会相应提高,但超过 某个浓度时,体系中的纳米金就会发生聚集。实验中 分别选择 25、50、75、100、125 mmol/L 五个 NaCl 陈化浓度进行优化。通过实验发现,当 DNA1 中 NaCl 的终浓度达到 100 mmol/L、DNA2 中的 NaCl 终浓度 达到 50 mmol/L 时,纳米金没有发生团聚,颜色仍然 保持红色,体系比较稳定。但是当 DNA1 中 NaCl 的 终浓度达到 125 mmol/L、DNA2 中 NaCl 的终浓度达 到 75 mmol/L 时,纳米金开始发生团聚,并且通过图 3的紫外-可见吸收图谱可知,峰的位置也发生了红移。 因此本试验选DNA1中NaCl的终浓度为100 mmol/L、 DNA2 中 NaCl 的终浓度为 50 mmol/L 为最佳的 NaCl 陈化浓度。图 4 表示体系中 NaCl 浓度的变化对纳米 金与 DNA1、DNA2 的结合率的影响,由图可知,随 着 NaCl 浓度的增加,纳米金与 DNA 的结合率也不断 提高,当 NaCl 浓度达到 100 mmol/L 时 DNA1 与纳米 金的结合率达到最高,当 NaCl 浓度达到 50 mmol/L 时 DNA2 与纳米金的结合率达到最高。

2.3.2 适配体与互补链浓度的优化

适配体、互补链可分别与纳米金结合,形成捕获 探针和信号探针。研究表明,固定在纳米金表面上的 适配体与互补链的量是影响到检测灵敏度的一个重要 因素。本实验选择了5个不同浓度的适配体、互补链 $(1 \times 10^{-9} \text{ mol/L}, 1 \times 10^{-8} \text{ mol/L}, 1 \times 10^{-7} \text{ mol/L}, 1 \times 10^{-6}$ mol/L、1×10⁻⁵ mol/L)对其进行优化。当适配体、互 补链分别与纳米金孵育、离心,然后取上清液进行紫 外分光光度计检测。由实验结果可知,当适配体与互 补链浓度在 1×10⁻⁹ mol/L~1×10⁻⁷ mol/L 浓度范围内时, 各自上清液在 260 nm 处未见明显吸收峰, 说明上清 液中适配体、互补链的含量很少,他们基本都固定在 纳米金表面,他们的量还不够;只有当适配体、互补 链浓度达到 1×10⁻⁶ mol/L 以上时,上清液在 260 nm 处 的吸光度明显开始增大,出现较强的吸收峰,说明上 清液中存在过量的适配体与互补链,固定在纳米金表 面的适配体与互补链已达到饱和的状态(图略)。因此 在后续的实验中我们选择 1×10⁻⁶ mol/L 作为适配体和 互补链的最佳浓度。

2.3.3 显色体系盐浓度的优化

试验中还对显色体系中盐的浓度进行了优化。前 人研究表明,因为高浓度的电解质可以屏蔽纳米金的 表面电荷,使纳米金粒子之间的排斥力变弱而发生聚 集^[19]。当待测物中含有盐酸克伦特罗时,适配体与盐 酸克伦特罗目标物结合,纳米金呈现游离的状态,在 一定的盐浓度下,纳米金表面的负电荷被屏蔽,纳米 颗粒间的排斥力减弱,发生聚集现象,使溶液显色, 由红色变为紫色,进而达到可视化检测的目的。但是 当检测体系中无盐酸克伦特罗目标物时,适配体与适 配体互补链结合,杂交形成稳定的网络结构,即使在 高盐状态下,仍不会发生聚集,颜色也不会发生变化, 保持红色。通过对比色体系中 NaCl 溶液浓度的优化, 发现当其浓度达到 50 mmol/L 时,含有盐酸克伦特罗 的待测样品,纳米金已开始发生聚集,颜色变为紫色。 但是在此浓度下,不含有盐酸克伦特罗的待测样品, 颜色仍然保持红色,仅当 NaCl 溶液浓度达到 100 mmol/L 时,纳米金产生聚集现象,颜色变为紫色(图 略)。因此,选择 50 mmol/L NaCl 浓度为显色体系盐 浓度。

2.4 线性范围与检测限

在最佳的实验条件下,A₅₄₀的值与盐酸克伦特罗浓度在 1~1000 ng/mL 范围内呈现良好的线性关系(图5),回归方程为 y=0.023x+0.362 (R²=0.991),随着盐酸克伦特罗浓度的增加,纳米金溶液的颜色由红色变为紫色。该方法的检测限为 1 ng/mL。



2.5 猪肝样品中盐酸克伦特罗的检测

按照实验部分所述,将建立的方法应用于实际样 品中盐酸克伦特罗的检测。由表1可知,猪肝样品中 盐酸克伦特罗的加标回收率在83.50%~101.80%之间, 与酶联免疫法对比,实验结果没有显著的差异。说明 本实验所建立的可视化检测方法准确度较高,可以用 于实际样品的测定。

T. I.I	
表1	猪肝实际样品中盐酸克伦特罗的检测及加标回收率

Table 1 The spike recovery of the analytics in pork liver (70)								
加仁并日始品	背景浓度/(ng/g)	添加浓度/(ng/g) -	测定值/(ng/g)		回收率/%			
加尔什四纳马			ELISA	本法	ELISA	本法		
1	ND	1.0	0.892	0.835	89.20	83.50		
2	ND	5.0	4.185	4.772	83.70	95.44		
3	ND	10.0	9.360	10.18	93.60	101.80		

注:ND 为未检出。

3 结论

由于金纳米颗粒具有独特的光学、化学、电化学 及催化性能,可实现对靶物质进行可视化检测。适配 体是一段具有三维空间结构的单链 DNA 或 RNA,它 可以与靶标发生特异性结合,在构建检测方法时,适 配体可以被用作一种优良的分子识别元件。经过多年 的发展,SELEX 技术已成为适配体筛选的一种重要方 法,成功应用于致病菌、真菌毒素、农药、重金属等 靶物质的筛选。本实验以适配体-纳米金为捕获探针, 以互补链-纳米金为信号探针,利用纳米金的光学特 性,实现了对盐酸克仑特罗的可视化快速检测。本实 验分别对适配体、互补链与纳米金连接的陈化盐浓度、 适配体与互补链浓度、显色体系盐浓度等参数进行了 优化,得出适配体、互补链与纳米金连接的陈化盐浓 度分别为 100 mmol/L、50 mmol/L,适配体与互补链 浓度均为 1×10⁻⁶ mol/L,显色体系盐浓度为 50 mmol/L。在最佳的实验条件下,该方法在 1~1000 ng/mL 范围内呈现良好的线性关系,最低检测限达到 1 ng/mL,5 min 内显色完毕,检测时间可在 1 h 左右 完成,且用肉眼观察实验结果。该方法操作简便、灵 敏度高、不需要复杂仪器设备,检测时间较短,有利 于现场定性快速筛查。

参考文献

- 朱坚,李波,方晓明,等.气相色谱-质谱法测定肝、肾和肉中 11种β-受体激动剂残留量[J].质谱学报,2005,26(3):129-137 ZHU Jian, LI Bo, FANG Xiao-ming, et al. Analysis of 11 β-agonist residues in liver, kidney and meat by gas chromatography-mass spectrometry [J]. Journal of Chinese Mass Spectrometry Society, 2005, 26(3): 129-137
- [2] 岳韩笑,雷雯,杜晓宁,等.同位素稀释-气相色谱-串联质谱 法测定猪肉中残留的 4 种 β-受体激动剂[J].质谱学报, 2018,39(1):61-68

YUE Han-xiao, LEI Wen, DU Xiao-ning, et al. Multi-residues analysis of 4 β -agonists in pork using isotope dilution gas chromatography-tandem mass spectrometry [J]. Journal of Chinese Mass Spectrometry Society, 2018, 39(1): 61-68

- [3] Liu BM, Yan HY, Qiao FY, et al. Determination of clenbuterol in porcine tissuesusing solid-phase extraction combined with ultrasound-assisted dispersiveliquid-liquid microextraction and HPLC-UV detection [J]. J. Chromatogr. B, 1879, 1: 90-94
- [4] 俞晓兰,夏宝林,张维益,等.超高效液相色谱-串联质谱法测 定鸡肉中 5 种 β-受体激动剂残留量[J].食品安全质量检测 学报,2018,9(16):4320-4325

YU Xiao-lan, XIA Bao-lin, ZHANG Wei-yi, et al. Determination of 5 kinds of β -agonist residues in chicken by ultraperformance liquid chromatography-tandem mass spectrometry [J]. Journal of Food Safety and Quality, 2018, 9(16): 4320-4325

[5] 罗辉泰,黄晓兰,吴惠勤,等.分散固相萃取/高效液相色谱-串 联质谱法快速测定饲料中 87 种药物残留[J].分析测试学 报,2015,34(9):979-985

LUO Hui-tai, HUANG Xiao-lan, WU Hui-qin, et al. Dispersive solid-phase extraction followed by liquid chromatography -tandem mass spectrometry for rapid determination of 87 kinds of drug residues in feedingstuffs [J]. Journal of Instrumental Analysis, 2015, 34(9): 979-985

[6] 杨丽君,徐成钢,安代志,等.膜透析/高效液相色谱-串联质谱 法测定畜产品中 9 种 β-受体激动剂残留[J].现代食品科 技,2015,31(11):298-306

YANG Li-jun, XU Cheng-gang, AN Dai-zhi, et al. Analysis of nine β -Agonist residues in livestock products by high performance liquid chromatography-tandem mass spectrometry coupled with membrane dialysis [J]. Modern Food Science and Technology, 2015, 31(11): 298-306

- [7] Zhang ZH, Yan H, Cui FY, et al. Analysis of multiple β-Agonist and β-blocker residues in porcine muscle using improved QuEChERS method and UHPLC-LTQ orbitrap mass spectrometry [J]. Food Anal Method, 2016, 9(4): 915-924
- [8] 周群标,桑亚新,王丽,等.动物性食品中盐酸克伦特罗
 ELISA 检测方法的建立及应用[J].中国食品学报,2011, 11(6):158-162
 ZHOU Qun-biao, SANG Ya-xin, WANG Li, et al.

Establishment and application of ELISA method for detection

of Clenbuterol hydrochloride in animal foods [J]. Journal of Chinese Institute of Food Science and Technology, 2011, 11(6): 158-162

- [9] 袁利鹏,卢倚群,孙远明,等.盐酸克伦特罗抗体纯化及直接 竞争 ELISA 方法研究[J].食品科学,2013,34(14):227-231
 YUAN Li-peng, LU Yi-qun, SUN Yuan-ming, et al. Purification of anti-Clenbuterol antibody and development of direct competitive ELISA [J]. Food Science, 2013, 34(14): 227-231
- [10] Zheng SL, Song SQ, Lan H, et al. Newly combined method of molecularly imprinted solid- phase extraction with ELISA for rapid detection of Clenbuterolin Animal-Tissue Samples [J]. Analytical Letters, 2009, 42: 600-614
- [11] 张洪才,刘春燕,刘国艳,等.基于免疫胶体金试纸条检测盐 酸克伦特罗的便携式光电型传感器[J].分析化学,2012, 40(6):852-856

ZHANG Hong-cai, LIU Chun-yan, LIU Guo-yan, et al. A portable photoelectric sensor based on colloidal gold immunochromatogrphic strips for rapid determination of clenbuterol in pig urine [J]. Chinese Journal of Analytical Chemistry, 2012, 40(6): 852-856

- [12] 肖治理,余建华,雷红涛,等.盐酸克伦特罗快速检测胶体金 试纸的研制[J].现代食品科技,2013,29(8):2004-2010
 XIAO Zhi-li, YU Jian-hua, LEI Hong-tao, et al. Development of a colloidal gold labeled strip for the rapid detection of Clenbuterol [J]. Modern Food Science and Technology, 2013, 29(8): 2004-2010
- [13] 赵凌国,丘汾,李伟,等.纳米金涂层毛细管电泳法快速检测 猪肉和内脏中 3 种 β2 受体激动剂[J].中国卫生检验杂志, 2015,25(10):1503-1507
 ZHAO Ling-guo, QIU Fen, LI Wei, et al. Rapid determination of three β2 -agonists in pork and liver by gold nanoparticles coated capillary electrophoresis [J]. Chin J Health Lab Tec, 2015, 25(10): 1503-1507
- [14] 梁世正,潘家荣,张弛,等.液相芯片技术同时检测莱克多巴 胺、盐酸克伦特罗和沙丁胺醇[J].分析化学,2016,44(4): 640-646

LIANG Shi-zheng, PAN Jia-rong, ZHANG Chi, et al. Simultaneous Detection of ractopamine, clenbuterol and salbutamol by suspension array technology [J]. Chinese Journal of Analytical Chemistry, 2016, 44(4): 640-646

[15] Ellington A D, Szostak J W. *In vitro* selection of RNA molecules that bind specific ligands [J]. Nature, 1990, 346 (6287): 818-822