

[19] 中华人民共和国国家知识产权局



[12] 发明专利申请公布说明书

[21] 申请号 200810046151.5

[51] Int. Cl.

G01N 33/543 (2006.01)

G01N 33/535 (2006.01)

[43] 公开日 2009年2月18日

[11] 公开号 CN 101368952A

[22] 申请日 2008.9.24

[21] 申请号 200810046151.5

[71] 申请人 四川大学

地址 610065 四川省成都市武侯区一环路南一段24号

[72] 发明人 邓安平 贺莉 杨红 李大伟

[74] 专利代理机构 成都科海专利事务有限责任公司

代理人 邓继轩

权利要求书2页 说明书10页 附图2页

[54] 发明名称

测定牛奶、猪肝、鸡肝和动物饲料中盐酸克伦特罗含量的酶联免疫吸附分析方法

[57] 摘要

本发明公开了测定牛奶、猪肝、鸡肝和动物饲料中盐酸克伦特罗含量的酶联免疫吸附分析方法(ELISA),其特点是合成盐酸克伦特罗的修饰物并将其与蛋白联接,制得免疫原及包被抗原。通过免疫动物获得四种兔抗盐酸克伦特罗的多克隆抗体。四种抗体均可用于盐酸克伦特罗的免疫分析,标准曲线的浓度范围为0.01~100ng/mL,IC<sub>50</sub>为0.1~0.9ng/mL,其中,灵敏度最高的ELISA的IC<sub>50</sub>为0.1~0.3ng/mL,较市售的ELISA试剂盒的灵敏度提高了5~50倍;四种抗体与沙丁胺醇的交叉反应率为25.37~45.83%,与其他9种可添加于动物饲料中的药物几乎没有交叉反应,说明所建立的ELISA特异性强。

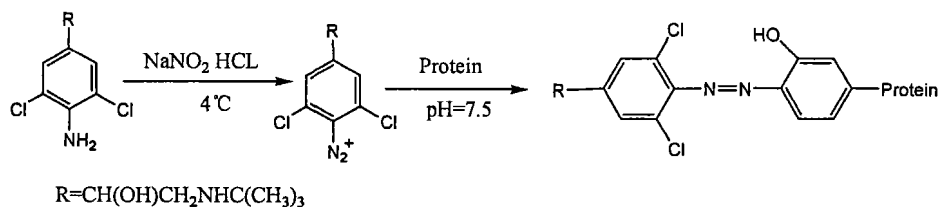
1. 测定牛奶、猪肝、鸡肝和动物饲料中盐酸克伦特罗含量的酶联免疫吸附分析方法，其特征在于该方法包括以下步骤：

(1) 盐酸克伦特罗修饰物的制备

将 1~5mg 盐酸克伦特罗溶解于 0.2~0.6mL 水中，缓慢滴加 0.1~0.3mL 浓度为 10~16.7mg/mL 的  $\text{NaNO}_2$  溶液，用盐酸调节混合液的 pH 值至 1.5，暗处 4℃ 反应过夜；取少量上述溶液，滴加到 N, N-二甲基苯胺中，溶液颜色由无色变为淡黄色，表明重氮化反应完成；5~11 mg 氨基磺酸胺溶解于 0.1~0.2 mL 水中，缓慢滴加到重氮盐溶液中，终止反应；

(2) 免疫原及包被抗原的制备

称取牛血清白蛋白 50~100 mg 和卵清蛋白 30~60 mg，分别溶解于 5mL 浓度为 0.01mol/L pH 7.5 的磷酸盐缓冲溶液中；将重氮化溶液缓慢滴加至蛋白质溶液中，加入少量 NaOH 溶液，使混合液的 pH 值保持在 7.5，搅拌下 4℃ 反应 4 小时；将混合物装入透析袋中，透析数天，获得两种盐酸克伦特罗-蛋白质溶液，冷冻干燥，-20℃ 保存待用；盐酸克伦特罗-牛血清白蛋白和盐酸克伦特罗-卵清蛋白分别用作免疫原及包被抗原；



(3) 盐酸克伦特罗多克隆抗体的制备

两种免疫原分别免疫两只兔子：将 1~4 mg 免疫原溶解于 0.5~4mL 的生理盐水中，加入 0.5~3mL 完全福氏佐剂，混合成油包水的乳浊液，每只兔子每次吸取 0.5~2.0mL 乳浊液，多次皮下注射入兔子背部，1~5 周后，对兔进行加强免疫，使用不完全福氏佐剂，其余与第一次免疫相同，第二次免疫后，2~5 周进行下一次免疫，并且第三次、第四次免疫后，5~7 天抽取 0.1~0.5mL 耳血，检测抗体产生的情况，第五次免疫后，5~15 天处死兔子，取全血，将血液在冰箱中放置过夜，吸取上层清液，分装，于低温冰箱中储存，有四种抗体，即盐酸克伦特罗-

牛血清白蛋白制备的抗体 I, II 和盐酸克伦特罗-卵清蛋白制备的抗体 III, IV;

(4) 建立测定盐酸克伦特罗含量的酶联免疫吸附分析方法

对所得抗体性能进行表征, 在最优试验条件下, 建立测定盐酸克伦特罗含量的 ELISA;

(5) ELISA 对加标样品中盐酸克伦特罗含量的测定

选择了 5 种阴性样品: 牛奶 I, 牛奶 II, 猪肝 I、鸡肝 I 和动物饲料 I 进行加标实验, 取 1~5g 样品, 加入 1~5  $\mu\text{L}$  的盐酸克伦特罗储备液, (1) 牛奶样品: 量取 1~5mL 牛奶样品于离心管中, 加入纯水稀释 1 倍, 漩涡仪漩涡 5 分钟, 加入浓度为 0.1 mol/L 盐酸 1~5mL, 水浴振荡器振荡半小时, 静置过夜, 次日超声萃取 15 分钟, 50 $^{\circ}\text{C}$  水浴加热, 离心, 取上层清液待测; (2) 肝脏样品: 市场购买的肝脏水洗去血, 晾干, 取适量肝脏样品切碎, 匀浆 5 分钟, 称取 1~5g 浆状样品, 加入浓度为 0.1 mol/L 稀盐酸 1~5mL, 水浴振荡器振荡半小时, 静置过夜, 次日超声萃取 15 分钟, 离心, 取上层清液待测; (3) 饲料样品: 取饲料样品, 研磨成细粉, 称 1~5g 样品, 加入浓度为 0.1 mol/L 稀盐酸 1~5mL, 水浴振荡器振荡半小时, 次日超声萃取 15 分钟, 离心, 取上层清液待测; 加标样品萃取液按 1:400~1:1000 稀释后用 ELISA 直接测定, 盐酸克伦特罗的加标回收率为 92.2~97.0%, 相对标准偏差为 1.3~5.3%, 说明方法准确性和精密度都比较好;

(6) ELISA 和 HPLC 的比较

盐酸克伦特罗的 HPLC 条件为: 色谱条件: Hypersil Gold 柱, 柱温为室温, 流动相为甲醇: 0.01 mol/L  $\text{NaH}_2\text{PO}_4$  水溶液=35:65, 流量 1 mL/min, 进样 20  $\mu\text{L}$ , 紫外检测波长: 240 nm, 盐酸克伦特罗标准溶液的浓度分别为: 0.5、1.0、2.0、5.0、10.0 和 20  $\mu\text{g}/\text{mL}$ , 样品萃取液用 0.45  $\mu\text{m}$  的滤膜过滤后直接测定;

所建立的 ELISA 的可靠性用 HPLC 进行进一步验证, 5 种加标样品, 即牛奶 I, 加标浓度 1  $\mu\text{g}/\text{mL}$ ; 牛奶 II, 加标浓度 2  $\mu\text{g}/\text{mL}$ ; 猪肝 I, 加标浓度 4  $\mu\text{g}/\text{g}$ ; 鸡肝 I, 加标浓度 5  $\mu\text{g}/\text{g}$ ; 动物饲料 I, 加标浓度 3  $\mu\text{g}/\text{g}$ ; 加标样品用浓度为 0.1 mol/L 盐酸萃取并用 ELISA 和 HPLC 测定, 测定结果以 ELISA 为横坐标, HPLC 为纵坐标作图得两者的相关曲线, 回归方程为  $Y=0.992X+0.469$ , 相关系数为 0.989,  $n=5$ , 说明二者的相关性很好。

## 测定牛奶、猪肝、鸡肝和动物饲料中盐酸克伦特罗含量的 酶联免疫吸附分析方法

### 技术领域

本发明涉及一种测定牛奶、猪肝、鸡肝和动物饲料中盐酸克伦特罗含量的酶联免疫吸附分析方法（ELISA），属于食品安全监督或食品分析的研究领域。

### 背景技术

盐酸克伦特罗（CL），俗称瘦肉精，化学名： $\alpha$ -（叔丁氨基）甲基-4-氨基-3,5-二氯苯甲醇盐酸盐，英文名：Clenbuterol hydrochloride，是一种人工合成的 $\beta$ -肾上腺素受体药物，它可选择性地作用于肾上腺素 $\beta_2$ 受体，引起交感神经兴奋，在治疗剂量下，具有松弛气管平滑肌作用，用于治疗哮喘，由于其对子宫平滑肌有较强松弛作用，也常用于延迟分娩。20世纪80年代，研究发现将一定量的盐酸克伦特罗加入动物饲料中，能够改变营养物质的代谢途径，促进动物肌肉特别是骨骼肌蛋白质的合成，同时抑制脂肪合成，从而促进动物生长，增加瘦肉率，于是盐酸克伦特罗在世界范围内作为动物饲料添加剂被广泛应用（Kuiper H. A. et al. Illegal use of  $\beta$ -adrenergic agonists: International. *Journal of Animal Science* 1998, 76: 195-207; Prezelj A. et al. Abuse of clenbuterol and its detection. *Current Medicinal Chemistry*. 2003, 10: 281-290）。它的添加给经营者带来巨大的利润，但是由于其在畜产品中的残留，给广大消费者的身体健康也造成了极大危害。

在家畜生产中使用的有效剂量一般是哮喘剂量的5~10倍，有较强的药性，溶解代谢率低，不易大量代谢排出，残留量较高。盐酸克伦特罗化学性质稳定，一般高温难以分解，作为一类激素，通过腺体深入到组织细胞膜内发挥作用，难以代谢清除。盐酸克伦特罗在动物血管系统中发生作用，使气管扩张，影响肌肉蛋白质代谢、脂肪代谢及肝脏中的糖代谢，严重影响动物正常的生长发育。人们食用含有盐酸克伦特罗残留的动物性食品，产生恶心、呕吐、头晕、心悸、乏力、面部和四肢肌肉颤动等现象，对高血压、心脏病患者危害更大，易引起心动过速、心室早搏、甚至危及生命。国内外曾发生多起

由盐酸克伦特罗引起的食物中毒事件(Pulce C. D. et al. Collective human food poisonings by Clenbutenol residues in Vealliver. *Veterinary and human toxicology*, . 1991, 33: 480-481; 柯华等. 一起盐酸克伦特罗引起食物中毒的调查与尿样检测. *中国卫生监督杂志*, 2003, 10(2): 91-93), 各国政府都禁止将盐酸克伦特罗作为饲料添加剂用于肉用动物的生产。我国农业部多次发布文件, 禁止在饲料中使用盐酸克伦特罗, 并严格检测市场肉制品中盐酸克伦特罗的含量(中华人民共和国农业部 农牧发 [1997]3 号; [2002]193 号)。

测定盐酸克伦特罗含量的方法主要有两类, 一类是色谱分析方法, 包括了高效液相色谱法、气相色谱-质谱联用法、液相色谱-质谱联用法、气相色谱傅立叶红外联用法、毛细管区带电泳法等。我国颁布的检测血液、组织等样品中盐酸克伦特罗的 HPLC 标准方法(GB/T5009.192-2003), 是利用 BOS(经碱去活处理)或 ODS 反相 C18 烷基硅胶柱(255nm×4.6mm, 5 $\mu$ m) 对样品进行分离, 选择波长为 244 nm, 流速 1.0 mL/min, 室温条件, 检出限 5ng/g。但是色谱法仪器昂贵、样品预处理复杂、费时、检测成本高; 另一类是免疫分析方法, 主要是酶联免疫吸附分析方法和胶体金免疫分析方法, 各种品牌的这两种免疫分析方法的快速检测试剂盒在市场上均有销售, 但是, 目前见到的测定盐酸克伦特罗的免疫分析方法的灵敏度不高, 亟待改进。

## 发明内容

本发明的目的是针对现有技术的不足而提供一种测定测定牛奶、猪肝、鸡肝和动物饲料中盐酸克伦特罗含量的酶联免疫吸附分析方法(ELISA), 其特点是以抗体和抗原与抗体之间特异性反应为基础而建立的高灵敏度、高特异性的分析方法。

本发明的目的由以下技术措施实现, 其中所述原料份数除特殊说明外, 均为重量份数。

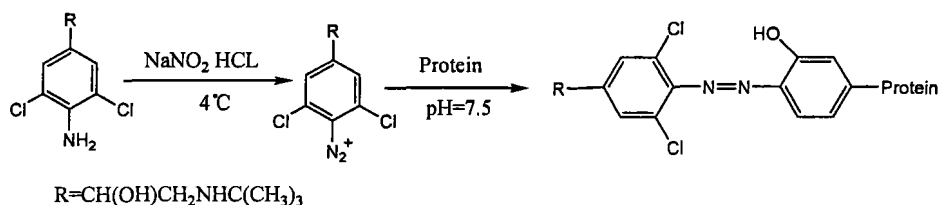
测定牛奶、猪肝、鸡肝和动物饲料中盐酸克伦特罗含量的酶联免疫吸附分析方法

### (1) 盐酸克伦特罗修饰物的制备

将 1~5mg 盐酸克伦特罗溶解于 0.2~0.6mL 水中, 缓慢滴加 0.1~0.3mL 浓度为 10~16.7 mg/mL 的 NaNO<sub>2</sub> 溶液, 用盐酸调节混合液的 pH 值至 1.5, 暗处 4℃ 反应过夜; 取少量上述溶液, 滴加到 N, N-二甲基苯胺中, 溶液颜色由无色变为淡黄色, 表明重氮化反应完成; 将 5~11 mg 氨基磺酸胺溶解于 0.1~0.2 mL 水中, 缓慢滴加到重氮盐溶液中, 终止反应。

### (2) 免疫原及包被抗原的制备

称取牛血清白蛋白 50~100 mg 和卵清蛋白 30~60 mg，分别溶解于 5 mL 浓度为 0.01 mol/L pH 7.5 的磷酸盐缓冲溶液中；将重氮化溶液缓慢滴加至蛋白质溶液中，加入少量 NaOH 溶液，使混合液的 pH 值保持在 7.5，搅拌下 4°C 反应 4 小时；将混合物装入透析袋中，透析数天，获得盐酸克伦特罗-蛋白质溶液，冷冻干燥，-20°C 保存待用；盐酸克伦特罗-牛血清白蛋白和盐酸克伦特罗-卵清蛋白分别用作免疫原及包被抗原。



### (3) 盐酸克伦特罗多克隆抗体的制备

两种免疫原分别免疫两只兔子：将 1~4 mg 免疫原溶解于 0.5~4 mL 的生理盐水中，加入 0.5~3 mL 完全福氏佐剂，混合成油包水的乳浊液，每只兔子每次吸取 0.5~2.0 mL 乳浊液，多次皮下注射入兔子背部，1~5 周后，对兔进行加强免疫，使用不完全福氏佐剂，其余与第一次免疫相同，第二次免疫后，2~5 周进行下一次免疫，并且第三次、第四次免疫后，5~7 天抽取 0.1~0.5 mL 耳血，检测抗体产生的情况，第五次免疫后，5~15 天处死兔子，取全血，将血液在冰箱中放置过夜，吸取上层清液，分装，于低温冰箱中储存，有四种抗体，即盐酸克伦特罗-牛血清白蛋白制备的抗体 I, II 和盐酸克伦特罗-卵清蛋白制备的抗体 III, IV。

### (4) 建立测定盐酸克伦特罗含量的酶联免疫吸附分析方法

对所得抗体性能进行表征，在最优试验条件下，建立测定盐酸克伦特罗含量的 ELISA。

本发明的优点：

1. 成功制备出抗盐酸克伦特罗的多克隆抗体并建立测定牛奶、猪肝、鸡肝和动物饲料中盐酸克伦特罗含量的酶联免疫吸附分析方法。
2. 灵敏度高：与大多数市售 ELISA 试剂盒相比，灵敏度提高 5~50 倍。
3. 特异性强：四种抗体与沙丁胺醇的交叉反应率为 25.37~45.83%，与其他 9 种可添加于动物饲料中的药物几乎没有交叉反应。
4. 样品处理简单、测试量大、测试费用低。
5. 对样品的测定，ELISA 与 HPLC 有很好的相关性。

## 附图说明

图 1. 为盐酸克伦特罗(CL)、牛血清白蛋白(BSA)和盐酸克伦特罗-牛血清白蛋白(CL-BSA)交联物的紫外-可见光谱图

由图 1 得知, CL 和 BSA 分别在 298 nm 和 280 nm 处有特征吸收峰, CL-BSA 在 325nm 有一肩峰, 为 CL 与 BSA 交联所形成的更大的共轭体系的特征峰, 表明盐酸克伦特罗已成功与蛋白交联。

盐酸克伦特罗(CL)、卵清蛋白(OVA)和盐酸克伦特罗-卵清蛋白(CL-OVA)交联物的紫外-可见光谱图与图 1 相似

图 2. 为四种多克隆抗体所建立的 ELISA 测定盐酸克伦特罗的标准曲线

■包被抗原 CL-OVA, 1:20,000 (e.g. 10 ng/well); 抗体 I, 1:100,000; 羊抗兔 IgG-辣根过氧化物酶(GaRIgG-HRP), 1:20,000;  $IC_{50}$  0.18 ng/mL; ●包被抗原 CL-OVA, 1:5,000 (e.g. 40 ng/well); 抗体 II, 1:10,000; GaRIgG-HRP 1:20,000;  $IC_{50}$  0.55 ng/mL; ▲包被抗原 CL-BSA, 1:5,000 (e.g. 40 ng/well); 抗体 III; 1:10,000; GaRIgG-HRP, 1:20,000;  $IC_{50}$  0.67 ng/mL; ▼包被抗原 CL-BSA 1:2,000 (e.g. 1000 ng/well); 抗体 IV, 1:10,000; GaRIgG-HRP 1:20,000;  $IC_{50}$  0.44 ng/mL。

由图 2 得知, 四种抗体均可用于盐酸克伦特罗的免疫分析, 标准曲线的浓度范围为 0.01~100 ng/mL, 灵敏度最高的 ELISA 的  $IC_{50}$  为 0.18 ng/mL, 其它三种 ELISAs 的  $IC_{50}$  分别为 0.55, 0.67 和 0.44 ng/mL。

图 3.为 ELISA 和 HPLC 对 5 个加标样品中盐酸克伦特罗的检测结果的相关曲线

由图 3 得知, 两种方法相关性较好, 回归方程为  $Y=0.992X+0.469$ , 相关系数为 0.989,  $n=5$ , 说明二者的相关性很好

## 具体实施方式

下面通过实施例对本发明进行具体的描述, 有必要在此指出的是本实施只用于对发明进行进一步说明, 但不能理解为对本发明保护范围的限制, 该领域的技术熟练人员可以根据上述发明的内容作出一些非本质的改进和调整。

实施例:

### 1. 盐酸克伦特罗修饰物的制备

将 1~5mg 盐酸克伦特罗溶解于 0.2~0.6mL 水中, 缓慢滴加 0.1~0.3mL 浓度为 10~16.7 mg/mL 的  $NaNO_2$  溶液, 用盐酸调节混合液的 pH 值至 1.5, 暗处 4℃反应过夜; 取少量上述溶液, 滴加到 N, N-二甲基苯胺中, 溶液颜色由无色变为淡黄色, 表明重氮

化反应完成；5~11 mg 氨基磺酸胺溶解于 0.1~0.2 mL 水中，缓慢滴加到重氮盐溶液中，终止反应。

## 2. 免疫原和包被抗原的制备

称取牛血清白蛋白 50~100 mg 和卵清蛋白 30~60 mg，分别溶解于 5 mL 浓度为 0.01 mol/L pH 7.5 的磷酸盐缓冲溶液中；将重氮化溶液缓慢滴加至蛋白质溶液中，加入少量 NaOH 溶液，使混合液的 pH 值保持在 7.5，搅拌下 4℃ 反应 4 小时；将混合物装入透析袋中，透析数天，获得盐酸克伦特罗-蛋白质溶液，冷冻干燥，-20℃ 保存待用；盐酸克伦特罗-牛血清白蛋白(CL-BSA)和盐酸克伦特罗-卵清蛋白(CL-OVA)分别用作免疫原及包被抗原。

CL、BSA 和 CL-BSA 交联物的紫外-可见光谱图如图 1 所示，CL、OVA 和 CL-OVA 交联物的紫外-可见光谱图与图 1 相似。

## 3. 盐酸克伦特罗多克隆抗体的制备

两种免疫原分别免疫两只兔子：将 1~4 mg 免疫原溶解于 0.5~4mL 的生理盐水中，加入 0.5~3mL 完全福氏佐剂，混合成油包水的乳浊液，每只兔子每次吸取 0.5~2.0mL 乳浊液，多次皮下注射入兔子背部，1~5 周后，对兔进行加强免疫，使用不完全福氏佐剂，其余与第一次免疫相同，第二次免疫后，2~5 周进行下一次免疫，并且第三次、第四次免疫后，5~7 天抽取 0.1~0.5mL 耳血，检测抗体产生的情况，第五次免疫后，5~15 天处死兔子，取全血，将血液在冰箱中放置过夜，吸取上层清液，分装，于低温冰箱中储存，有四种抗体，即 CL-BSA 免疫原制备的抗体 I, II 和 CL-OVA 免疫原制备的抗体 III, IV。

## 4. 优化实验条件，建立测定盐酸克伦特罗的酶联免疫吸附分析方法（ELISA）

对所得抗体性能进行表征，在最优试验条件下，建立测定牛奶、猪肝、鸡肝和动物饲料中盐酸克伦特罗含量的酶联免疫吸附分析方法。

### （1）溶液配制

#### （a）碳酸钠-碳酸氢钠缓冲液

称取 2.606g  $\text{Na}_2\text{CO}_3 \cdot 10\text{H}_2\text{O}$ , 3.434g  $\text{NaHCO}_3$ , 用 800mL 超纯水混匀溶解后，调节 pH 值，加水至 1 L，配成 0.05 mol/L, pH=9.6 的碳酸钠-碳酸氢钠缓冲液；

#### （b）磷酸缓冲液（储备液，PBS×10）

称取 21.961g  $\text{Na}_2\text{HPO}_4 \cdot 12\text{H}_2\text{O}$ , 6.031g  $\text{NaH}_2\text{PO}_4 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$ , 87.666g  $\text{NaCl}$ , 加 800 mL 超纯水混合，加热溶解；用 1 mol/L 的 NaOH 调节 pH=7.5，加超纯水至 1 L，配

成含 0.15 mol/L NaCl, pH=7.5 的 0.1 mol/L 磷酸缓冲液 (储备液) ;

(c) 酪蛋白溶液

称取酪蛋白加热溶解于 0.01 mol/L 的 PBS 中, 配成 1.0%酪蛋白溶液;

(d) 磷酸缓冲液-吐温储备液 (含 1%Tween20 的 0.1 mol/L 磷酸缓冲液, PBST×10, pH=7.5) ;

(e) 盐酸克伦特罗标准溶液的配制 (0.5 mg/mL)

0.005g CL 溶解于 5 mL 纯水;

(f) CL-OVA 和 CL-BSA 交联物的配制 (1 mg/mL)

用微量天平称 CL-OV 或 CL-BSA 交联物 5 mg, 加入 5 mL 超纯水溶解;

(g) 底物溶液 (20 mL 纯水; 1 mL 醋酸钠缓冲液; 200  $\mu$ L 四甲基联苯胺 (TMB) (1%) ; 20  $\mu$ L 过氧化氢 (5%) ) ;

(i) 醋酸钠缓冲液

称取 3.450g  $\text{CH}_3\text{COONa}\cdot 3\text{H}_2\text{O}$ , 用 100 mL 超纯水溶解, 再用 1 mol/L 柠檬酸 (21.031g  $\text{C}_6\text{H}_8\text{O}_7\cdot \text{H}_2\text{O}$  溶解于 100 mL 水中) 调节 pH=5.8 后, 再用水定容到 250 mL, 配成 0.1 mol/L 醋酸钠缓冲液;

(ii) TMB: 称取 0.0717g TMB, 用 7.17 mL 二甲基亚砷溶解, 混匀, 配成 1%, w/v;

(iii) 过氧化氢: 取 20  $\mu$ L 30%的过氧化氢加入 100  $\mu$ L 超纯水中, 混匀, 配成 5%;

(h)  $\text{H}_2\text{SO}_4$  溶液: 移取 25 mL 浓  $\text{H}_2\text{SO}_4$ , 溶解于 475 mL 的超纯水中, 配成 5%  $\text{H}_2\text{SO}_4$  溶液。

(2) 主要仪器

洗板机: A5082, Tecan, Austria; 酶标仪: A2082, Tecan, Austria; 高效液相色谱仪: Alltech-001

(3) 间接竞争 ELISA 步骤

(a) 用包被抗原包板, 每孔 200  $\mu$ L, 4 $^{\circ}$ C 过夜;

(b) PBST 缓冲液 (PBST 储备液 1: 10 稀释) 满孔洗涤三次;

(c) 加入酪蛋白溶液封阻, 每孔 280  $\mu$ L, 室温放置 1 小时;

(d) PBST 缓冲液洗板三次;

(e) 依次每孔加入 100  $\mu$ L 的标准溶液和 100  $\mu$ L 的一定稀释度的多克隆抗体, 室温放置 1 小时;

- (f) PBST 缓冲液洗板三次;
- (g) 加入酶标二抗 (羊抗兔 IgG-辣根过氧化物酶, GaRIgG-HRP), 每孔 200  $\mu$ L, 室温放置 1 小时;
- (h) PBST 缓冲液洗板三次;
- (i) 加入底物液显色, 每孔 200  $\mu$ L, 振摇 15~20 分钟;
- (j) 加入 5%  $H_2SO_4$  溶液, 每孔 80  $\mu$ L, 终止反应;
- (k) 用酶标仪测定吸光度值, 做出标准曲线, 进行结果分析与讨论。

#### (4) ELISA 实验条件的优化

本发明对包被抗原和抗体的不同组合、包被抗原的浓度、抗体的稀释度、酶标二抗的稀释度等作了优化, 优化结果为如表 1 所示。

#### (5) ELISA 的标准曲线及灵敏度

盐酸克伦特罗标准溶液的浓度为: 0, 0.01, 0.03, 0.1, 0.3, 1.0, 10, 100 ng/mL, 由盐酸克伦特罗的储备液 1.0 mg/mL 经过纯水稀释而得。以盐酸克伦特罗浓度的对数为横坐标, 以相对信号  $B/B_0 \times 100\%$  为纵坐标做标准曲线 ( $B_0$ : 盐酸克伦特罗标液浓度为 0 ng/mL 所对应的吸光度值; B: 其他各浓度对应的吸光度值)。图 2 为四种多克隆抗体所建立的 ELISA 测定盐酸克伦特罗的标准曲线, 表 1 在最佳实验条件下的  $IC_{50}$  值,  $IC_{50}$  在 0.1~0.9 ng/mL 之间; 抗体 I 所建立的 ELISA 灵敏度最高,  $IC_{50}$  为 0.1~0.3 ng/mL。

#### (6) ELISA 的特异性

ELISA 特异性可用交叉反应率来表示。交叉反应率 (CR%) = (盐酸克伦特罗的  $IC_{50}$ /测试物质的  $IC_{50}$ )  $\times 100\%$ 。交叉反应率越小, ELISA 的特异性越高。

在本发明选择沙丁胺醇及其他 9 种可添加于动物饲料中的药物进行交叉反应实验, 交叉反应物的结构及交叉反应实验如表 2、表 3 所示。四种抗体与沙丁胺醇的交叉反应率为 25.37~45.83%, 与其他 9 种可添加于动物饲料中的药物几乎没有交叉反应; 说明所建立的 ELISA 特异性强。

### 5. ELISA 对加标样品中盐酸克伦特罗含量的测定

选择了 5 种阴性样品: 牛奶 I, 牛奶 II, 猪肝 I、鸡肝 I 和动物饲料 I 进行加标实验, 取 1~5g 样品, 加入 1~5  $\mu$ L 的盐酸克伦特罗储备液, (1) 牛奶样品: 量取 1~5mL 牛奶样品于离心管中, 加入纯水稀释 1 倍, 漩涡仪漩涡 5 分钟, 加入浓度为 0.1 mol/L 盐酸 1~5mL, 水浴振荡器振荡半小时, 静置过夜, 次日超声萃取 15 分钟, 50 $^{\circ}$ C 水

浴加热，离心，取上层清液待测；(2) 肝脏样品：市场购买的肝脏水洗去血，晾干，取适量肝脏样品切碎，匀浆 5 分钟，称取 1~5g 浆状样品，加入浓度为 0.1 mol/L 稀盐酸 1~5mL，水浴振荡器振荡半小时，静置过夜，次日超声萃取 15 分钟，离心，取上层清液待测；(3) 饲料样品：取饲料样品，研磨成细粉，称 1~5g 样品，加入浓度为 0.1 mol/L 稀盐酸 1~5mL，水浴振荡器振荡半小时，次日超声萃取 15 分钟，离心，取上层清液待测；加标样品萃取液按 1:400~1:1000 稀释后用 ELISA 直接测定，盐酸克伦特罗的加标回收率为 92.2~97.0%，相对标准偏差为 1.3~5.3%，说明方法准确性和精密度都比较好。

#### 6. ELISA 和 HPLC 的比较

盐酸克伦特罗的 HPLC 条件为：色谱条件：Hypersil Gold 柱，柱温为室温，流动相为甲醇: 0.01 mol/L NaH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub> 水溶液=35:65，流量 1 mL/min，进样 20 μL，紫外检测波长：240 nm，盐酸克伦特罗标准溶液的浓度分别为：0.5、1.0、2.0、5.0、10.0 和 20 μg/mL，样品萃取液用 0.45 μm 的滤膜过滤后直接测定。

所建立的 ELISA 的可靠性用 HPLC 进行进一步验证，5 种加标样品，即牛奶 I，加标浓度 1 μg/mL；牛奶 II，加标浓度 2 μg/mL；猪肝 I，加标浓度 4 μg/g；鸡肝 I，加标浓度 5 μg/g；动物饲料 I，加标浓度 3 μg/g；加标样品用 0.1 mol/L 盐酸萃取并用 ELISA 和 HPLC 测定，测定结果以 ELISA 为横坐标，HPLC 为纵坐标作图得两者的相关曲线，如图 3 所示，回归方程为  $Y=0.992X+0.469$ ，相关系数为 0.989，n=5，说明二者的相关性很好。

#### 7. ELISA 测定真实样品中盐酸克伦特罗含量

从超市中购得 6 个牛奶样，从农贸市场中购得 3 个猪肝样和 3 个鸡肝样，从农资市场购得 4 个动物饲料样，用所建立的灵敏度最高的 ELISA 对上述 16 个样品进行测定，测定结果如表 4 所示。结果表明，饲料样品中 75% 都含有盐酸克伦特罗，最高浓度达 64.03 ng/g；牛奶、猪肝和鸡肝样品中均发现含有盐酸克伦特罗，最高浓度分别为 5.33 ng/mL、2.28 ng/g 和 0.74 ng/g。

表1 ELISA 最佳实验条件及 IC<sub>50</sub> 值

包被抗原	包被抗原		编号	抗体		IC <sub>50</sub> 值 (ng/ml)
	稀释度	浓度 ng /well		稀释度	稀释度	
CL-OVA	1: 20000	10	I	1: 100, 000	1: 20000	0.1-0.3
CL-OVA	1: 5000	40	II	1: 10000	1: 20000	0.4-0.7
CL-BSA	1: 5000	40	III	1: 10000	1: 20000	0.6-0.9
CL-BSA	1: 2000	100	IV	1: 10000	1: 20000	0.4-0.8

表2 交叉反应物质的化学结构

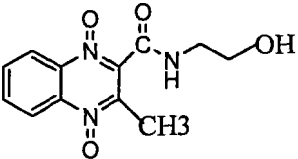
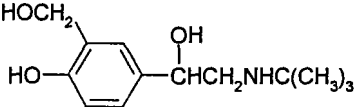
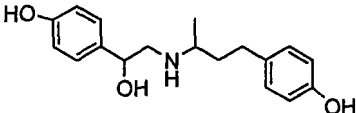
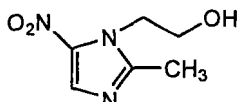
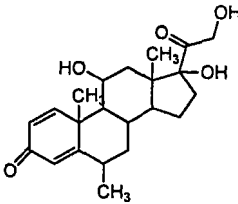
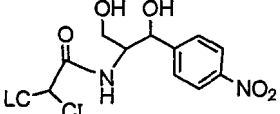
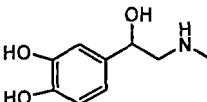
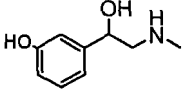
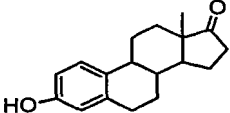
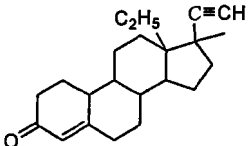
	
Olaquinoxolone 喹乙醇	Salbutamol 沙丁胺醇
	
Ractopamine 莱克多巴胺	Metronidazole 甲硝唑
	
Methylprednisolone 甲泼尼龙	Chloramphenicol 氯霉素
	
Adrenaline 肾上腺素	Phenylephrine 去氧肾上腺素
	
Estrone 雌酮	L-18-Levonorgestrel 18-甲基炔诺酮

表3 四种抗体的交叉反应实验结果

交叉反应物	交叉反应率 (%)			
	抗体 I	抗体 II	抗体 III	抗体 IV
clenbuterol	100	100	100	100
salbutamol	26.05	25.37	45.83	39.30
ractopamine	<0.01	<0.01	<0.01	<0.01
metronidazole	<0.01	<0.01	<0.01	<0.01
methylprednisolone	<0.01	<0.01	<0.01	<0.01
chloramphenicol	<0.01	<0.01	<0.01	<0.01
adrenaline	<0.01	<0.01	<0.01	<0.01
phenylephrine	<0.01	<0.01	<0.01	<0.01
estrone	<0.01	<0.01	<0.01	<0.01
L-18-levonorgestrel	<0.01	<0.01	<0.01	<0.01
olaquinox	<0.01	<0.01	<0.01	<0.01

表4 ELISA 测定真实样品中盐酸克伦特罗含量

样品种类	检出浓度	相对标准偏差 (%)
	(ng/ml 或 ng/g)	
牛奶 1	2.72 ± 0.21	7.7
牛奶 2	5.33 ± 0.32	6.0
牛奶 3	4.85 ± 1.15	23.7
牛奶 4	2.25 ± 0.25	11.1
牛奶 5	2.80 ± 0.48	17.1
牛奶 6	未检出	-
猪肝 1	0.45 ± 0.01	2.2
猪肝 2	未检出	-
猪肝 3	2.28 ± 0.11	4.8
鸡肝 1	0.36 ± 0.01	2.8
鸡肝 2	0.74 ± 0.03	4.1
鸡肝 3	0.29 ± 0.01	3.4
饲料 1	3.08 ± 0.44	14.3
饲料 2	10.69 ± 3.09	28.9
饲料 3	64.03 ± 1.47	2.3
饲料 4	未检出	-

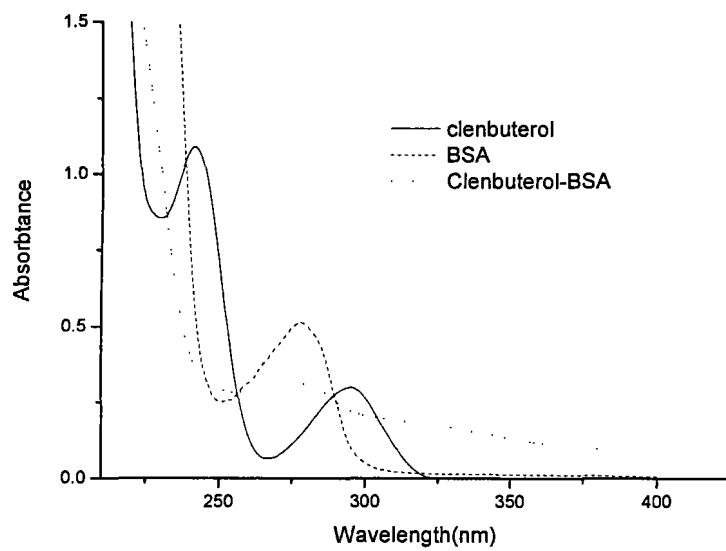


图 1

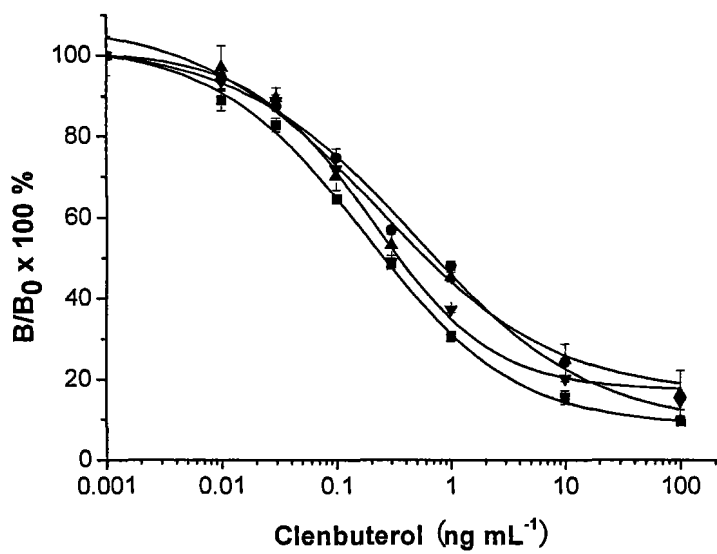


图 2

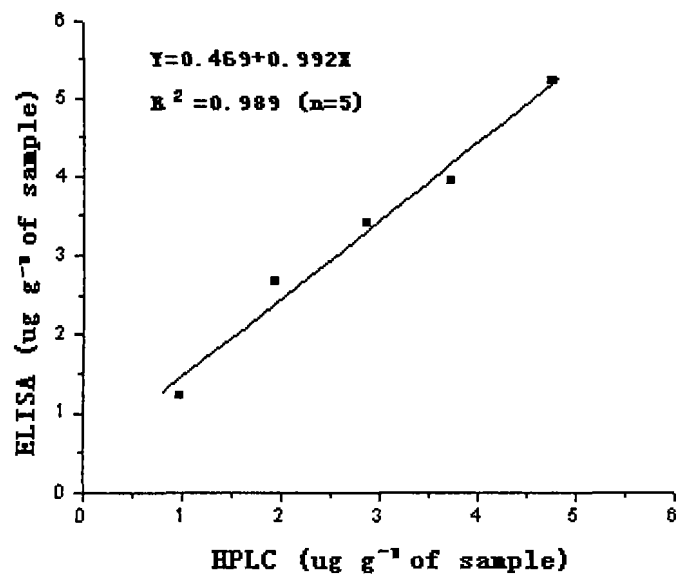


图 3

专利名称(译)	测定牛奶、猪肝、鸡肝和动物饲料中盐酸克伦特罗含量的酶联免疫吸附分析方法		
公开(公告)号	<a href="#">CN101368952A</a>	公开(公告)日	2009-02-18
申请号	CN200810046151.5	申请日	2008-09-24
[标]申请(专利权)人(译)	四川大学		
申请(专利权)人(译)	四川大学		
当前申请(专利权)人(译)	四川大学		
[标]发明人	邓安平 贺莉 杨红 李大伟		
发明人	邓安平 贺莉 杨红 李大伟		
IPC分类号	G01N33/543 G01N33/535		
其他公开文献	CN101368952B		
外部链接	<a href="#">Espacenet</a> <a href="#">SIPO</a>		

摘要(译)

本发明公开了测定牛奶、猪肝、鸡肝和动物饲料中盐酸克伦特罗含量的酶联免疫吸附分析方法(ELISA)，其特点是合成盐酸克伦特罗的修饰物并将其与蛋白联接，制得免疫原及包被抗原。通过免疫动物获得四种兔抗盐酸克伦特罗的多克隆抗体。四种抗体均可用于盐酸克伦特罗的免疫分析，标准曲线的浓度范围为0.01~100ng/mL，IC50为0.1~0.9ng/mL，其中，灵敏度最高的ELISA的IC50为0.1~0.3ng/mL，较市售的ELISA试剂盒的灵敏度提高了5~50倍；四种抗体与沙丁胺醇的交叉反应率为25.37~45.83%，与其他9种可添加于动物饲料中的药物几乎没有交叉反应，说明所建立的ELISA特异性强。

