

盐酸克伦特罗的 AlphaLISA 检测方法的建立

赵芳¹, 岳振峰¹, 吕敬章¹, 洪丹璇², 张恒¹, 刘慧玲¹, 黄欣迪¹, 洪小柳^{1*}

(1. 深圳出入境检验检疫局, 深圳 518045; 2. 广东药学院食品科学学院, 广州 528458)

摘要: **目的** 采用纳米均相时间分辨荧光免疫技术(amplified luminescent proximity homogeneous assay, AlphaLISA)建立高灵敏检测盐酸克伦特罗(clenbuterol, CLB)残留的方法。**方法** 在发光微粒上固定 CLB, 与游离的 CLB 共同竞争固定在感光微粒上的 CLB 单克隆抗体, 优化检测条件并进行方法学考核。**结果** 该方法的灵敏度为 0.04 ng/mL。猪肉样品回收率在 83%~109%之间, 牛肉样品回收率在 92%~112%之间; 猪肉样品检测的批内变异系数 CV<10%、批间变异系数 CV<15%。与特布他林、沙丁胺醇的交叉反应率分别为 34.5%、25.7%, 与莱克多巴胺、妥布特罗、齐帕特罗无交叉反应。**结论** CLB-AlphaLISA 检测肉类中克伦特罗残留具有简单、快速、灵敏性高、特异性强、稳定等特点, 具有广阔的应用前景。

关键词: 盐酸克伦特罗; 纳米均相时间分辨荧光免疫技术(AlphaLISA); 竞争反应

Quantitative determination of clenbuterol using the amplified luminescent proximity homogeneous assay

ZHAO Fang¹, YUE Zhen-Feng¹, LV Jing-Zhang¹, HONG Dan-Xuan², ZHANG Heng¹,
LIU Hui-Ling¹, HUANG Xin-Di¹, HONG Xiao-Liu^{1*}

(1. Shenzhen Entry-Exit Inspection and Quarantine Bureau, Shenzhen 518045, China;
2. School of Food Science of Guangzhou pharmaceutical university, Guangzhou 528458, China)

ABSTRACT: Objective A direct competitive amplified luminescent proximity homogeneous assay (AlphaLISA) for detecting clenbuterol (CLB) was established. **Methods** CLB was coated on emitting particles, and competed with sample CLB to anti-CLB which was coated on photosensitive particles. The analytical performance and optimal test conditions of the method were studied. **Results** The sensitivity of the assay was 0.04 ng/mL. The recoveries of the determination for CLB in pork and beer were respectively 83%~109% and 92%~112%. The CV of intra- and inter-assay were <10% and <15% respectively. The cross-reactivity of the CLB-AlphaLISA with ractopamine, tulobuterol and zilpaterol was negligible, while that with terbutaline and salbutamol was 34.5% and 25.7% respectively. **Conclusion** The CLB-AlphaLISA had the characteristics of excellent specificity and sensitivity, and good precision and economy. It could be widely used in rapid screening for CLB contamination in meat or foods in the future.

KEY WORDS: clenbuterol; amplified luminescent proximity homogeneous assay (AlphaLISA); competing reaction

基金项目: 深圳出入境检验检疫局科技项目(SZ2011001)、国家科技支撑计划项目(2012BA08B01-5)

Fund: Supported by Shenzhen CIQ Science & Technology Program (SZ2011001) and National Sci-Tech Support Plan (2012BA08B01-5)

*通讯作者: 洪小柳, 本科, 工程师, 主要研究方向为食品微生物及兽药残留检测。E-mail: 35770092@qq.com

*Corresponding author: HONG Xiao-Liu, Engineer, Shenzhen Entry-Exit Inspection and Quarantine Bureau, No.1011, Fuqiang Road, Futian District, Shenzhen 518045, China. E-mail: 35770092@qq.com

盐酸克伦特罗(clenbuterol, CLB), 是一种人工合成的 β -肾上腺素能兴奋剂, 化学名称为 α -[(叔丁氨基)甲基]-4-氨基-3,5-二氧苯甲醇盐酸盐, 为白色或类白色的结晶粉末。CLB进入动物体内, 能够促进动物骨骼肌中蛋白质的合成, 提高瘦肉率, 因此也称为“瘦肉精”。20世纪70年代, 美国等发达国家对CLB的实用性进行开发研究, 80年代被广泛应用到畜禽生产中^[1]。由于CLB在动物肠道内吸收快, 作用时间长, 尤其在动物肝脏等器官造成残留, 人在食用了含有CLB的动物产品后, 可引起心慌、恶心、呕吐、头痛, 甚至能致人猝死。1986年, 欧洲共同体等发达国家已严禁在畜禽生产中使用CLB^[2], 我国也在1973年严禁在饲料和畜牧生产中使用CLB^[3]。

目前国内外常用的检测CLB的方法有高效液相色谱法(high performance liquid chromatography, HPLC)、气相色谱-质谱法(gas chromatography-mass spectrometry, GC-MS)和酶联免疫吸附法(enzyme linked immunosorbent assay, ELISA)^[4-6]等。HPLC和GC-MS法所需设备昂贵、检测周期较长、操作复杂, 在实际中受到一定限制, 通常作为确定性的定量检测方法; ELISA法是食品残留检测中常见的方法, 但该方法存在酶标记物容易失活、操作繁琐、假阳性率高等缺点, 且灵敏性已不能满足越来越低的限量要求。

AlphaLISA技术是超微量检测领域中出现的新兴检测技术, 被誉为免洗的ELISA, 具有快速、均相(免洗)、灵敏性高、特异性强和操作简便等特点^[7-12]。因此, 本研究建立了CLB-AlphaLISA检测方法, 较ELISA法具有更高的灵敏性、稳定性和特异性, 检测限相当于HPLC和GC-MS。

1 材料与方法

1.1 材料

1.1.1 试剂: CLB、沙丁胺醇、莱克多巴胺、特布他林、齐帕特罗、妥布特罗为德国Dr.Ehrenstorfer公司产品; CLB单克隆抗体购自北京圣迪隆生物科技有限公司; CLB酶免试剂盒为荷兰Euro-Proxima公司产品; 生物素和牛血清白蛋白(BSA)为美国Sigma公司产品; 标记有链霉亲和素(SA)的发光微粒和标记有Protein A的感光微粒检测试剂盒(6760617C)为美

国PE公司产品; 检测样品由本实验室保存; 其他试剂均为国产分析纯。

1.1.2 设备: 水浴锅系德国Mettler公司产品, 多标记微孔板检测仪(EnSpire 2300)及白色不透明微孔板均为美国PerkinElmer公司产品; 酶标仪为美国BIO-RAD公司产品; 离心机为德国Eppendorf公司产品。

1.2 方法

1.2.1 CLB标准品的配制: 准确称取2.30 mg CLB, 用甲醇定容体积至10.0 mL, 配制成浓度为200 mg/L的储存母液。用PBS(0.05 mol/L, pH 7.4)将CLB储存母液倍比稀释, 制成100、10、1、0.1、0.01 ng/mL的CLB标准溶液。

1.2.2 生物素-CLB-BSA的制备: 用0.1 mol/L的盐酸溶液溶解CLB至4 mmol/L, 缓慢滴加1% NaNO₂, 滴加过程中用淀粉-KI试纸测定, 直至试纸变成蓝黑色, 停止滴加, 并持续反应30 min, 即得CLB重氮液; 用硼酸缓冲液溶解BSA(pH 9.0, 0.2 mol/L), 边搅拌边加入重氮液, 并滴加NaOH并调节pH至9.0~9.5, 避光搅拌反应2 h; 用PBS(pH 7.4)避光透析; 取5 mg生物素, 加入200 μ L DMF, 滴加到BSA-克伦特罗偶联物(4 mg/mL), 反应12 h, 透析24 h; 分装, -20 $^{\circ}$ C保存。

1.2.3 感光微粒和发光微粒的配制: 将试剂盒(6760617C)中10 $\times$ buffer按说明配制成1 $\times$ buffer, 用配制好的1 $\times$ buffer将感光微粒和发光微粒稀释成0.1 mg/mL。

1.2.4 样品的预处理: 称取匀浆后的组织样品1.0 g, 加入1 mL盐酸溶液(0.01 mol/L), 涡旋2 min, 4 $^{\circ}$ C 5000 g离心10 min。取250 μ L上清液到1.5 mL的EP管中, 加入5 μ L氢氧化钠(2 mol/L), 4 $^{\circ}$ C 5000 g离心10 min, 吸取上清液10 μ L用于检测。

1.2.5 检测步骤: 取白色不透明微孔板, 每孔加入10 μ L ProteinA-感光微粒(0.1 mg/mL), 10 μ L CLB单克隆抗体(1 mg/mL), 37 $^{\circ}$ C避光孵育30 min; 然后依次加入10 μ L待测样品或标准品、10 μ L生物素-CLB-BSA、10 μ L SA-发光微粒(0.1 mg/mL), 充分混匀, 37 $^{\circ}$ C避光孵育1 h。在多标记微孔板检测仪上测定每个待测孔的光信号强度, 绘制标准曲线, 根据标准曲线计算出待测样品中CLB的含量。

2 结果与分析

2.1 生物素-CLB-BSA 及 IgG-CLB 的工作浓度的选择

用 PBS 将 IgG-CLB 分别作 1:10、1:50、1:100、1:300、1:900 稀释, 每种浓度加入到白色微孔板一条, 其中最后一个孔作空白对照只加 PBS, 每种浓度各做一个平行。用 PBS 将生物素-CLB-BSA 做一系列稀释: 1:400、1:800、1:1600、1:3200、1:6400、1:12800、1:25600。按照 1.2.5 的检测步骤检测, 将待测样品替换成 PBS(零浓度点), 检测各稀释度的荧光值(counts per second, CPS), 结果见表 1。从结果可知, IgG-CLB

浓度在 1:100~1:300 倍稀释, 生物素-CLB-BSA 浓度在 1:6400 倍稀释时的荧光值较高, 在此浓度范围内加入不同稀释浓度的标准品进行检测, 通过考察 ED₅₀和从节约成本的角度, 选择 IgG-CLB 1:300 倍稀释, 生物素-CLB-BSA 1:6400 倍稀释较为合适。

2.2 反应温度及时间的优化

在 25 ℃和 37 ℃温度下, 选择标准品浓度为: 0、0.01、0.1、1、10 ng/mL, 按照 1.2.4 的步骤分别选择 30、60、90 min 作为竞争反应的时间。上机检测各浓度点不同温度及时间点的荧光值, 经 origin 软件处理后的结果见图 1。由图 1 可知在相同温度条件下, 随着竞争反应时间的延长, 各检测浓度点的荧光值增

表 1 生物素-CLB-BSA 和 IgG-CLB 工作浓度的选择(荧光计数(CPS))
Table 1 Selection of the working concentrationbotins of botin-CLB-BSA and IgG-CLB (fluorescence count (CPS))

生物素-CLB-BSA 稀释倍数	IgG-CLB 的稀释倍数					空白对照
	1:10	1:50	1:100	1:300	1:900	
1:400	118076	108506	41473	16376	9121	4465
1:800	290463	216569	57740	18746	7443	5294
1:1600	485732	327998	250756	25942	10232	4068
1:3200	581169	396913	713288	60350	18312	3837
1:6400	744176	521978	1096839	543050	87562	3403
1:12800	721792	549321	807985	393839	75309	3430
1:25600	512398	425085	795191	122757	66027	2089

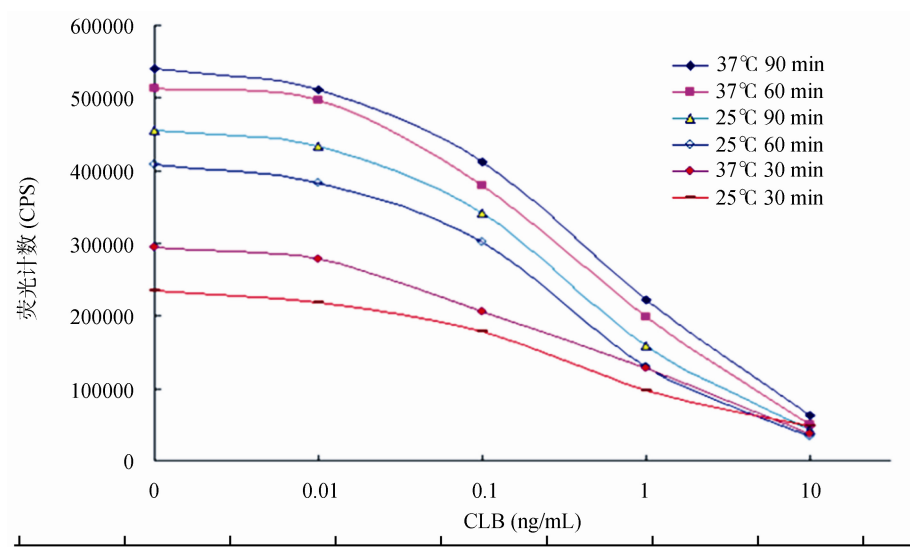


图 1 不同温度及时间对反应的影响
Fig. 1 The effects of the different temperature and time

大。竞争反应时间相同时, 37 ℃条件下的荧光值高于 25 ℃时的荧光值。在 37 ℃温度下, 反应 60 min 与 90 min 时 ED_{50} 所对应的浓度无明显差别, 分别为 0.84 ± 0.01 ng/mL 和 0.86 ± 0.03 ng/mL。因此, 选择 37 ℃、60 min 作为 CLB-AlphaLISA 检测方法的竞争温度及时间。

2.3 标准曲线的绘制

根据优化好的最佳反应条件, 选择不同浓度的标准品, 上机检测荧光值, 结果经 origin 软件处理后绘制标准曲线, 见图 2。

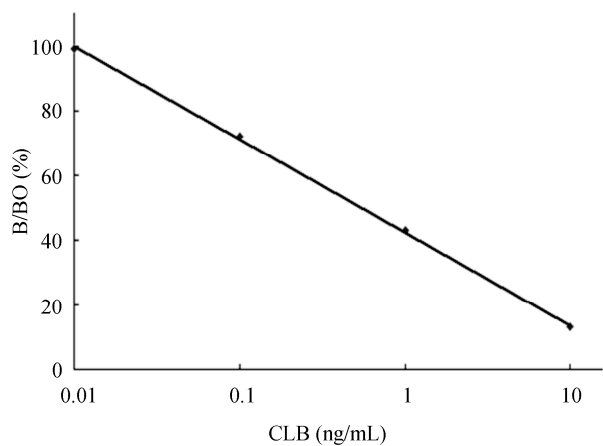


图 2 CLB-AlphaLISA 标准曲线
Fig. 2 The standard curve of CLB-AlphaLISA

2.4 灵敏性和稳定性

计算 10 组标准曲线零浓度点的平均值($\bar{X}$)和标

准差(SD), 以 $\bar{X}$ 的数值减 2 倍 SD 所得的数值从标准曲线中找到对应浓度即为检测灵敏性^[13], 建立的 CLB-AlphaLISA 方法的检测灵敏性为 0.04 ng/mL。10 次测量的 ED_{50} CV 值<10%, 说明建立的方法稳定。

2.5 特异性

将 CLB 与沙丁胺醇、莱克多巴胺、特布他林、齐帕特罗、妥布特罗这五种 CLB 的结构类似物分别配制成 0.01~10 ng/mL 的待测溶液, 用建立的 CLB-AlphaLISA 方法进行检测, 测定 ED_{50} 时的浓度值, 结果显示 CLB 与特布他林、沙丁胺醇的交叉反应率分别为: 34.5%、25.7%, 与莱克多巴胺、妥布特罗、齐帕特罗无交叉反应, 说明该方法的特好。

2.6 回收率

将已知浓度的 CLB 标准品分别添加到 CLB 阴性的猪肉和牛肉样品中, 样品经预处理后采用已建立的 CLB-AlphaLISA 方法进行检测, 每份样品重复检测 3 次。根据检测结果平均值计算各添加的回收率, 结果见表 2。猪肉回收率范围在 83%~109%之间, 牛肉回收率范围在 92%~112%之间。

2.7 精密度

选择 CLB 阴性的猪肉样品, 分别添加不同浓度的 CLB 标准品, 每个浓度每天平行检测 10 次, 连续检测 10 天, 计算各浓度的均数($\bar{X}$)、标准差(SD)以及变异系数, 结果见表 3。结果表明, 该检测方法符合批内 CV<10%, 批间 CV<15%的要求。

表 2 加标回收率测定结果($n=3$)
Table 2 The results of recoveries ($n=3$)

样品名称	CLB 添加量($\mu\text{g/kg}$)	测定平均值($\mu\text{g/kg}$)	回收率(%)
猪肉	0.1	0.095 ± 0.013	95.4
	1	0.83 ± 0.092	83.2
	10	10.90 ± 0.78	109.3
牛肉	0.1	0.092 ± 0.011	92.3
	1	0.96 ± 0.089	96.1
	10	11.2 ± 0.81	112.4

表 3 精密度测定结果($n=10$)
Table 3 The results of precision ($n=10$)

CLB 浓度(ng/kg)	批内			批间		
	$\bar{X}$	SD	CV(%)	$\bar{X}$	SD	CV(%)
0.5	0.42	0.03	7.14	0.48	0.01	12.50
1	1.02	0.09	8.82	0.83	0.11	13.25
10	10.52	0.82	7.79	10.11	0.89	8.80

3 讨 论

随着经济全球化和食品国际贸易的迅速发展, 食品安全的重要性越来越凸显, 由 CLB 等有害残留物质引起的食品安全事件频频发生, 食品中有害残留物的检测和监控已引起世界各国的普遍重视。世界各国对食品中的痕量有害物质残留的检测方法的灵敏性的要求也越来越高, 需要达到 ng/mL 或 ng/mL 级。传统的 ELISA 方法很难满足这么低的检测限量要求, 常用的气质联用法和液质联用法操作步骤繁琐、需要贵重仪器, 在实际应用中受到一定限制。

AlphaLISA 技术是超微量检测领域中一项新兴的检测技术, 该技术实现了均相、一步、免清洗, 具有检测时间短、灵敏性高和特异性强的特点。本研究选择目前非常急需和敏感的 CLB 残留作为检测目标物质, 建立了 CLB-AlphaLISA 检测方法, 该方法操作简单、样品用量少, 检测的灵敏性达到 0.04 ng/mL, 高于目前常用 CLB-ELISA 检测试剂盒 0.1 ng/mL 的检测低限, 达到了 HPLC 和 CG-MS 的检测低限。同时该方法具有较高的特异性、稳定性和精密性, 适用于 CLB 的定量检测, 具有广阔的应用前景。

参考文献

[1] Smith D. The pharmacokinetics, metabolism, and tissue residues of beta-adrenergic agonists in livestock [J]. J Anim Sci, 1998, 76(1): 173-194.

[2] 刘国艳, 柴春彦. 动物性产品中盐酸克伦特罗 (瘦肉精) 检测方法研究进展[J]. 动物科学与动物医学, 2002, 19(4): 32-34.

Liu GY, Chai CY. Research progress of Clenbuterol hydrochloride in animal products [J]. Anim Sci Vet Med, 2002, 19(4): 32-34.

[3] 董淑丽, 曹战鑫, 王娟, 等. 猪肝脏中盐酸克伦特罗残留量的检测[J]. 河南科技大学学报 (自然科学版), 2005, 4: 22.

Dong SL, Cao ZL, Wang J, *et al.* Detection of Clenbuterol hydrochloride residue in pork liver[J]. J Henan Univ Sci Technol (Nat Sci), 2005, 4: 22.

[4] 林奕芝, 刘奋, 戴京晶, 等. 高效液相色谱法测定肉与肉制品中盐酸克伦特罗残留量[J]. 中国卫生检验杂志, 2002, 12(2): 180-181.

Lin YZ, Liu F, Dai JJ, *et al.* High performance liquid chromatography determination of clenbuterol hydrochloride in meat and meat products residues[J]. Chin J Health Lab Technol, 2002, 12(2): 180-181.

[5] 吴银良, 李晓薇, 刘素英, 等. 气相色谱-质谱法测定肝脏组织中盐酸克伦特罗和盐酸莱克多巴胺[J]. 分析化学, 2006, 34(8): 1083-1086.

Wu YL, Li XW, Liu SY, *et al.* Gas chromatography - mass spectrometry determination of clenbuterol hydrochloride and lake dopamine hydrochloride in liver tissue[J]. Chin J Anal Chem, 2006, 34(8): 1083-1086.

[6] 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 QB, Sang YX, Wang L, *et al.* Establishment and application of ELISA detection method of Clenbuterol hydrochloride in animal food stuff [J]. J Chin Inst Food Sci Technol, 2011, 11(6): 158-162.

[7] Ullman EF, Kirakossian H, Switchenko A, *et al.* Luminescent oxygen channeling assay (LOCI): sensitive, broadly applicable homogeneous immunoassay method [J]. Clin Chem, 1996, 42(9): 1518-1526.

[8] Cauchon E, Liu S, Percival MD, *et al.* Development of a homogeneous immunoassay for the detection of angiotensin I in plasma using AlphaLISA acceptor beads technology [J]. Anal Biochem, 2009, 388(1): 134-139.

[9] Szekeres PG, Leong K, Day TA, *et al.* Development of Homogeneous 384-Well High-Throughput Screening Assays for A β 1-40 and A β 1-42 Using AlphaScreen™ Technology [J]. J Biomol

- Screen, 2008, 13(2): 101-111.
- [10] Zhang Y, Huang B, Zhang J, *et al.* Development of a homogeneous immunoassay based on the AlphaLISA method for the detection of chloramphenicol in milk, honey and eggs [J]. *J Sci Food Agr*, 2012, 92(9): 1944-1947.
- [11] Schneider S, Chen H, Tang J, *et al.* Development of a homogeneous AlphaLISA ubiquitination assay using ubiquitin binding matrices as universal components for the detection of ubiquitinated proteins [J]. *BBA Mol Cell Res*, 2012, 1823(11): 2038-2045.
- [12] Zhao LL. Establishment and Evaluation of Time-resolved Fluoroimmunoassay and LICA for Enrofloxacin [D]. Jiangnan University, 2011.
- [13] 周彬, 高雷, 金坚, 等. 纳米均相时间分辨荧光免疫法检测脱氧雪腐镰刀菌烯醇方法的建立 [J]. *食品工业科技*, 2010, 31(8): 338-342.
- Zhou B, Gao L, Jin J, *et al.* Quantitative determination of deox-

ynivalenol using light initiated chemiluminescence assay [J]. *Sci Technol Food Ind*, 2010, 31(8): 338-342.

(责任编辑: 赵静)

作者简介



赵芳, 硕士, 工程师, 主要研究方向为食品微生物及兽药残留检测。
E-mail: zff@163.com



洪小柳, 本科, 工程师, 主要研究方向为食品微生物及兽药残留检测。
E-mail: siluerhxl@163.com