

克伦特罗和莱克多巴胺多残留胶体金免疫层析试纸条的研制

姜金庆^{1,2}, 杨雪峰¹, 王自良^{1*}, 邓瑞广², 王选年², 张改平^{2*}

(1. 河南科技学院动物科学学院, 新乡 453003; 2. 河南省动物免疫学重点实验室, 郑州 453003)

摘要: 本试验旨在研制同时检测克伦特罗(CL)和莱克多巴胺(RAC)的多残留胶体金免疫层析试纸条(Multi-strip)。用细胞融合技术筛选 CL 和 RAC 杂交瘤细胞株, 制备单克隆抗体, 金标抗体竞争性膜层析技术研制 Multi-strip。该试纸条由样品垫、偶联垫、双检测线和质控线标记的 NC 膜、吸收垫等几部分构成, 其中偶联垫上灌注有 CL 和 RAC 两种金标单克隆抗体, 双检测线由检测抗原 CL-OVA 和 RAC-BSA 喷膜构成, 间距 2 mm。结果表明: 多残留试纸条的 CL 和 RAC 目测检测限分别为 1 和 2 ng · mL⁻¹, 检测时间 5~8 min。基质呈阳性的真实样品用单残留试纸条、ELISA 和 GC-MS 检测, 结果一致, 无假阳性或假阴性案例。该试纸条具有快速、敏感、特异、简便等特点, 适合于现场检测和筛选。

关键词: 克伦特罗; 莱克多巴胺; 单克隆抗体; 胶体金; 多残留试纸条

中图分类号: S859.84

文献标志码: A

文章编号: 0366-6964(2013)01-0087-08

Development of a Monoclonal Antibody Based Colloidal Gold Immunochromatography Strip for Multianalysis of Clenbuterol and Ractopamine

JIANG Jin-qing^{1,2}, YANG Xue-feng¹, WANG Zi-liang^{1*}, DENG Rui-guang²,
WANG Xuan-nian², ZHANG Gai-ping^{2*}

(1. College of Animal Science, Henan Institute of Science and Technology, Xinxiang 453003, China; 2. Henan Provincial Key Laboratory of Animal Immunology, Zhengzhou 453003, China)

Abstract: The objective of this study was to develop a colloidal gold-labeled multianalysis strip assay (Multi-strip) for the simultaneous detection of clenbuterol (CL) and ractopamine (RAC) residues. Hybridoma lines that secrete monoclonal antibody (mAb) against CL and RAC were filtered through cell fusion technology and their immunological traits were characterized. The colloidal gold-based immunochromatography competition method was employed to develop a Multi-strip, which consisted of a sample pad, a conjugate pad, a NC membrane containing two test lines and a control line, and an absorbent pad. The gold-labelled CL mAb and RAC mAb were sprayed onto the conjugate pad, and the test lines were separately coated with CL-OVA and RAC-BSA, 2 mm in distance. The visual detection limits of Multi-strip were 1 and 2 ng · mL⁻¹ for CL and RAC, respectively, and the results can be judged within 5-8 min. Parallel analysis of natural positive matrices with CL and RAC showed consistent results obtained from the individual strip, ELISA and GC-MS, without false-positive or false-negative cases. This Multi-strip possesses rapidity, sensitivity, specificity and simplicity, and is suitable for on-site screening and qualitative determination.

收稿日期: 2012-05-28

基金项目: “十一五”国家科技支撑计划重大项目(2006BAK02A21/1); 河南省教育厅科技攻关项目资助(2011A230003)

作者简介: 姜金庆 (1973-), 男, 河南方城人, 副教授, 博士, 主要从事动物源食品安全免疫学快速检测方法研究, Tel: 0373-3040079, E-mail: jjq5678@126.com

* 通信作者: 张改平, E-mail: zhanggaiping2003@126.com; 王自良, E-mail: wangzl_2008@yahoo.com.cn

Key words: clenbuterol; ractopamine; monoclonal antibody; colloidal gold; multianalysis strip

克伦特罗 (Clenbuterol, CL) 和莱克多巴胺 (Ractopamine, RAC) 同属于苯乙醇胺类 β -肾上腺素受体兴奋剂, 添加于畜牧养殖饲料中时, 可促进肌肉生长、降低脂肪含量, 提高酮体的瘦肉率^[1]。但 β -兴奋剂化合物对人体有急性中毒、心脏毒性、生殖毒性等危害作用, 世界多数国家都禁止其作为生长促进剂应用于动物生产^[2]。此类药物残留检测的主要方法有高效液相色谱法 (HPLC)^[3]、液质联用 (LC-MS)^[4]、气质联用 (GC-MS)^[5], 以及酶联免疫吸附试验 (ELISA)^[6] 等。其中, 理化方法灵敏度高、特异性强, 但样品前处理繁琐, 需要专业的技术人员和昂贵的实验仪器, 不适合大批量的市场监测要求。而 ELISA 方法建立在抗体对抗原的分子识别上, 其主要优点是亲和力高、快速、简单、经济实用, 能够实现对生物液体的小体积、大通量检测, 逐渐成为世界各国有毒有害残留物快速筛选的方法之一。

胶体金标记免疫分析法是近年来迅速发展的一种新型分析技术, 其特点是简便快速、成本低、无污染、无需培训, 非常适合于现场检测。与 ELISA 相比, 具有样品前处理简单, 显色时间短 (5~10 min), 且所有试剂包含在一根试纸条上, 无需仪器等优点, 具有广阔的市场前景和应用价值。因此, 本研究室已分别开发出检测 CL^[7] 和 RAC^[8] 的免疫层析试纸条, 并推广应用。兽药残留检测最有效的途径是建立同类药品具备多残留检测能力的免疫学筛选方法, 然后再用 GC-MS 等理化方法进行确证。目前, 代表性的多残留免疫学检测方法有 ELISA^[9] 和胶体金试纸条^[10-11] 等, 但中国尚未有 β -兴奋剂多残留免疫学检测方法的报道。本研究旨在研制同时检测 CL 和 RAC 的多残留胶体金层析试纸条, 并比较了间接竞争 ELISA (icELISA) 和传统单残留胶体金试纸条的检测性能。

1 材料与方法

1.1 材料与试剂

盐酸克伦特罗 (CL)、莱克多巴胺 (RAC) 和其它 β -兴奋剂标准品购自 Sigma 公司; 免疫原 CL-BSA 和 RAC-OVA、检测抗原 CL-OVA 和 RAC-BSA、羊抗鼠酶标二抗 (GaMIgG-HRP) 为本课题组自备; 小鼠骨髓瘤 NS0 细胞株由英国国家动物健康研究院惠赠; 弗氏完全佐剂 (FCA) 和弗氏不完全佐剂

(FIA) 为美国 Pierce 公司产品; 细胞培养基 RPMI-1640、HAT、HT 和 PEG-1500 购自美国 Gibco 公司; 氯金酸 (HAuCl_4) 和柠檬酸三钠 ($\text{Na}_3\text{C}_6\text{H}_5\text{O}_7 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$) 购于上海化学试剂公司; 硝酸纤维素膜 (NC 膜)、支持板、吸收垫、玻璃棉、样品垫和胶膜均为德国 Spitzenberger & Spies 公司产品; 其它试剂为 AR 级; 6~8 周龄 BALB/c 小鼠购自北京医科大学动物实验中心, 本实验室动物房繁育。

MULTISKAN MK3 酶标仪为美国 Thermo 公司生产; SZ-97 自动三重蒸馏水器购自上海雅荣生化仪器有限公司; X-only 单向喷点仪和 CM4000 切割机均为美国 Biodot 公司产品。

1.2 CL 和 RAC 单克隆抗体的制备

免疫原 CL-BSA 和 RAC-OVA 分别免疫 BALB/c 小鼠, 选择效价高、抑制效果好的小鼠进行细胞融合; 参照 J. Q. Jiang 等^[12] 的融合程序筛选杂交瘤细胞株; 体内诱生腹水法制备单克隆抗体。

1.3 间接竞争 ELISA (icELISA) 检测方法

用碳酸盐缓冲液 (CBS) 稀释的检测抗原 CL-OVA 或 RAC-BSA 包板, 每孔 $100 \mu\text{L}$, 4°C 孵育过夜。洗液 (PBST) 洗板 3 次后用 $250 \mu\text{L} \cdot \text{孔}^{-1}$ 的封闭液 37°C 封闭 2 h。再次洗板后加入 $50 \mu\text{L} \cdot \text{孔}^{-1}$ 不同浓度的标准品溶液, 同时加入等体积适当稀释倍数的单克隆抗体溶液, 37°C 温育 15 min, PBST 洗板 3 次。然后加入经稀释液 1:1000 倍稀释的 GaMIgG-HRP, 每孔 $50 \mu\text{L}$, 37°C 温育 25 min, PBST 洗板 3 次。加入 $60 \mu\text{L} \cdot \text{孔}^{-1}$ 新鲜配制的酶底物溶液, 室温下显色 15 min, 然后加入 $100 \mu\text{L} \cdot \text{孔}^{-1} 2 \text{ mol} \cdot \text{L}^{-1} \text{H}_2\text{SO}_4$ 终止酶促反应。以抑制率 B/B_0 (%) 为纵坐标 (B 和 B_0 是 CL 或 RAC 在不同浓度时的 $A_{450 \text{ nm}}$ 值), 以不同浓度的标准品为横坐标, 绘制标准曲线, 进行相关分析。灵敏度以半数抑制浓度 (IC_{50} 值) 表示; 定量检测限 ($\text{IC}_{20} - \text{IC}_{80}$) 代表标准品对最大信号强度 (B_0) 的抑制范围; 检测限以 IC_{15} 表示^[13]。抗体特异性以交叉反应率 (CR) 表示, 计算公式是: $\text{CR} / \% = (\text{CL 或 RAC 的 } \text{IC}_{50}) / (\text{功能类似物的 } \text{IC}_{50}) \times 100$, CR 越低, 抗体特异性越强。

1.4 胶体金免疫层析试纸条的研制

1.4.1 胶体金溶液的制备 取超纯水溶解的 0.01% 氯金酸溶液 100 mL, 置电炉加热至沸腾, 3 min 后边搅拌, 边迅速加入 1% 的柠檬酸三钠溶液 2

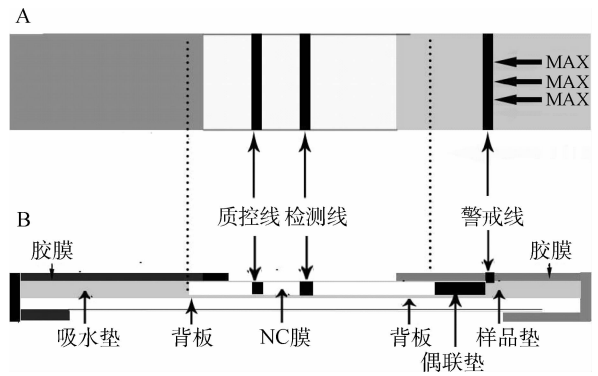
mL。继续加热,溶液颜色由无色转为浅黄色,最后变为橙红色时停止加热。冷却后用超纯水恢复至原体积,进行透射电镜扫描,鉴定胶体金质量及颗粒大小。胶体金悬液中加入最终质量浓度为 0.05% 的叠氮钠(NaN_3),4 °C 冰箱中保存备用。

1.4.2 金标抗体的制备 酶标板用每孔 50 μL 双蒸水铺底,纵排加入倍比稀释的 CL mAb(或 RAC mAb),每孔 50 μL ,设空白对照(BC)。用 0.1 $\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$ K_2CO_3 调节胶体金溶液至 pH 9.0,加入到酶标板中,每孔 50 μL 混匀。室温孵育 15 min 后,加入 10% NaCl 溶液 100 μL ,混匀,静置。对照孔与 mAb 量不足以稳定金溶胶的各孔呈现由红变蓝的聚沉现象,而 mAb 量达到或超过最低稳定量的各孔仍保持红色不变。选择不聚沉时 mAb 的最低量,在此基础上增加 20%,即为待标 mAb 的实际用量。

将事先确定的最佳标记蛋白量与胶体金偶联,常温搅拌 30 min,5 000 $\text{r} \cdot \text{min}^{-1}$ 离心 20 min,弃上清后,加入 10% BSA 硼酸钠溶液,使 BSA 终浓度为 1% 作为稳定剂。金标抗体溶液 10 000 $\text{r} \cdot \text{min}^{-1}$ 离心 30 min,弃上清,用 20 $\text{mmol} \cdot \text{L}^{-1}$ 的硼酸盐稀释液(含 1% BSA 和 0.1% 叠氮钠)将金标抗体恢复至原体积的 1/10,放置在 4 °C 冰箱备用。

1.4.3 单残留胶体金试纸条的研制 参照文献[7]、[8]的方法,组装克伦特罗(CL-strip)和莱克多巴胺(RAC-strip)单残留检测试纸条。试纸条主要由 NC 膜、样品垫、偶联垫、吸收垫和支持板等几部分构成(图 1)。将 NC 膜置于 X-only 单向喷点仪平台上,检测抗原 CL-OVA 或 RAC-BSA 放于 A 池, RaMIgG 放于 B 池,展平压紧,开机后将抗原和二抗分别点射于 NC 膜上,形成检测线(T)和质控线(C)。室温自然干燥后,将其浸入封闭液(1% BSA 的 PBS 缓冲液,pH 7.4)中 30 min,37 °C 烘干后,加入干燥剂,4 °C 密封保存。将玻璃纤维棉裁成 6 mm 的细条,放入含 5% BSA,2% 蔗糖,0.8% NaCl 和 0.05% NaN_3 的 PBS 处理液中 20 min,37 °C 恒温烘干,然后将金标抗体灌注已处理好的玻璃纤维棉上,真空冻干 4 h,即为偶联垫。样品垫要用含 2% BSA,1% 蔗糖,0.5% 硼酸钠和 0.1% NaN_3 的 PBS 处理后,干燥备用。在支持板(PVC 板)上,将 NC 膜、偶联垫、样品垫、吸水垫和胶膜等按一定工艺组装在一起(叠压宽度为 2 mm),用 CM4000 切割机制成 4 mm 宽的试纸条,放入带干燥剂的密闭容器

中储存。



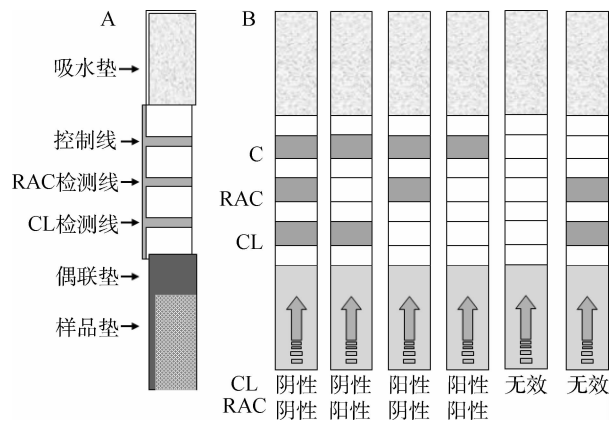
A. 平面图;B. 侧面图

A. Top-view; B. Cross-section

图 1 单残留胶体金免疫层析试纸条示意

Fig. 1 Schematic diagram of colloidal gold-labeled individual test strip

1.4.4 多残留胶体金试纸条的研制 参照文献[11]的方法,研制同时检测克伦特罗和莱克多巴胺的多残留检测试纸条(Multi-strip),其组装示意图和结果判定见图 2。多残留试纸条的样品垫和吸收垫同单残留试纸条,但 NC 膜上的 T 线有 2 条,分别是检测抗原 CL-OVA 和 RAC-BSA,间距 2 mm。偶联垫上同时灌注有 CL 和 RAC 两种金标单克隆抗体,其比例关系依据单残留检测试纸条的检测线确定。



A. 剖面图;B. 检测图

A. Top-section; B. Detection

图 2 克伦特罗和莱克多巴胺多残留胶体金试纸条示意

Fig. 2 Schematic diagram of colloidal gold-labeled multi-strip for CL and RAC

1.4.5 试纸条检测原理 试纸条根据抗原抗体竞争性免疫层析原理设计。滴加样品后,在 NC 膜的毛细作用下,样品溶液向上迁移,到达偶联垫时,

金标抗体将被溶解。当样品中含有 CL 或 RAC 时,它们将和金标抗体结合,并一起向上迁移,到达固定有 CL-OVA 或 RAC-BSA 的检测线位置时,检测抗原将和标准品竞争结合金标抗体上有限的抗原结合位点。样品中 CL 或 RAC 含量越高,检测抗原和金标抗体结合数量就越少,T 线显色就越弱;当 CL 或 RAC 高于一定数值时,检测抗原就无法和金标抗体结合,T 线不显色。无论样品中是否有 CL 或 RAC 存在,过量的金标抗体或检测抗原与金标抗体的结合物都将和二抗 RaMIgG 结合,在 C 线形成红色。

1.4.6 检测试纸性能测定 用含 30% 甲醇的 PBS 配制不同浓度的 CL、RAC 及 CL/RAC 混合待测液,验证试纸条的有效性。按照试纸条操作要求进行检测,每个浓度设 6 个重复,以 T 线显色基本消失为依据,判断检测限;将试纸条置 4 °C 冰箱中密封保存 12 个月,每隔 1 个月检查一次活性,查看其稳定性;取不同批次的 6 批试纸条进行检测,每个浓度设 6 个重复,检验其重复性;配制不同浓度的 β -兴奋剂标准品溶液,按照要求进行操作,判断试纸条特异性。

1.5 待测样品的预处理

猪尿样:采集新鲜尿样放于 4 °C 冰箱中待检,一般不需特殊处理,可直接用于试纸条检测;ELISA 检测时,用 PBS 将尿样稀释 10 倍后检测;若尿液中有污染和混浊,5 000 r·min⁻¹ 离心 10 min 或过滤后检测。**饲料样:**取 10 g 研钵研碎后的饲料样品,加入 15 mL PBS、2 mL 乙酸乙酯和 2 mL 1 mol·L⁻¹ NaOH,搅拌 30 min,5 000 r·min⁻¹ 离心 10 min,上清液用 1 mol·L⁻¹ HCl 调节 pH 值至中性后用于试纸条检测;试纸条检测时样品稀释 2 倍,若用于 ELISA 检测,再用 PBS 稀释至 10 倍。**猪肉样:**称取去脂肉样 10 g,加入 15 mL PBS、2 mL 乙酸乙酯和 2 mL 1 mol·L⁻¹ NaOH 匀浆,余下操作和稀释倍数同饲料样。

2 结果与分析

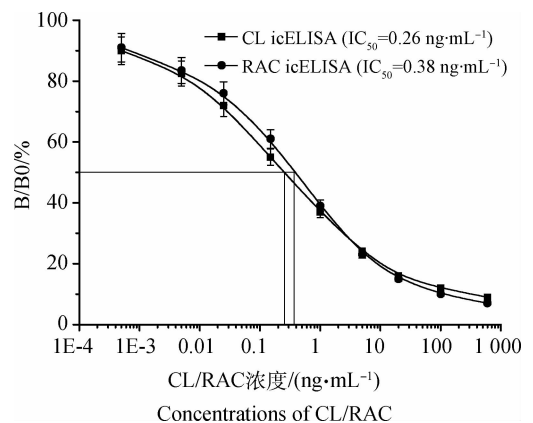
2.1 杂交瘤细胞株的筛选及抗体特性

细胞融合 10 d 后观察融合效果,CL-BSA 和 RAC-OVA 免疫小鼠的脾细胞融合率分别为 89% 和 82%;间接 ELISA 和竞争 ELISA 检测细胞上清,阳性率分别为 22% 和 18%;有限稀释法 3 次亚克隆后,分别筛选出 9 株和 6 株抗体分泌稳定的杂交瘤细胞株。体内诱生腹水法制备杂交瘤细胞株的

单克隆抗体,腹水纯化后的蛋白质含量为 3.6~8.4 mg·mL⁻¹;细胞株单抗亚类均为 IgG₁ 型,具 *k* 轻链;方阵滴定法检测抗体效价和灵敏度,最终筛选出抗 CL 杂交瘤细胞株 C1D3E5 和抗 RAC 杂交瘤细胞株 R2C1A6 建立 icELISA 标准曲线,研制胶体金免疫层析试纸条。

2.2 间接竞争 ELISA 标准曲线

依据检测抗原和抗体用量少的原则,选择 A_{450 nm} 值为 1.5~2.0 时,检测抗原和抗体的最大稀释倍数为理想工作浓度,因此确定 CL 实验体系中 CL-OVA 最佳包被质量浓度为 2 μ g·mL⁻¹,抗 CL mAb 的最佳工作浓度为 1:40 000 倍稀释;RAC 实验体系中 RAC-BSA 最佳包被质量浓度为 1.0 μ g·mL⁻¹,抗 RAC mAb 的最佳工作浓度为 1:20 000 倍稀释。优化的间接竞争 ELISA(icELISA)标准曲线如图 3 所示,CL 标准曲线的回归方程式为 $y = -7.095 \ln(x) + 58.958$ ($R^2 = 0.9627$),IC₅₀ 值为 0.26 ng·mL⁻¹;RAC 标准曲线的回归方程式为 $y = -6.559 \ln(x) + 56.228$ ($R^2 = 0.9636$),IC₅₀ 值为 0.38 ng·mL⁻¹。根据公式计算出 CL 标准曲线在 PBS 中的线性检测范围为 0.04~26 ng·mL⁻¹,检测限(LOD)为 0.02 ng·mL⁻¹;RAC 标准曲线在 PBS 中的线性检测范围为 0.04~38 ng·mL⁻¹,LOD 为 0.02 ng·mL⁻¹。



用含 30% 甲醇的 PBS(pH 7.4) 配制标准品溶液,每次检测 3 个重复

CL/RAC were diluted in PBS (pH 7.4) with 30% methanol. Data represent the means of 3 determinations

图 3 CL 和 RAC 间接竞争 ELISA 标准曲线

Fig. 3 Standard inhibition curves for CL and RAC

2.3 特异性

抗体的交叉反应性决定特异性,以 CL 和 RAC 同类 β -兴奋剂药物替换标准品溶液,进行交叉反应试验,以 CL 或 RAC 的 IC₅₀ 值同各竞争物的 IC₅₀ 值

的百分比作为其交叉反应率,结果见表 1。由 C1D3E5 细胞株生产的 CL mAb 除与沙丁胺醇有轻微交叉反应(0.8%)外,与其它 β -兴奋剂无交叉反应($CR < 0.05$);由 R2C1A6 细胞株生产的 RAC mAb 除与多巴酚丁胺有轻微交叉反应(9.6%)外,与其它

β -兴奋剂无交叉反应($CR < 0.05$)。因此,CL mAb 和 RAC mAb 特异性强,免疫学检测时其它化合物干扰程度小,可用于胶体金免疫层析试纸条的研制。

表 1 CL mAb 和 RAC mAb 与 β -兴奋剂化合物的交叉反应率

Table 1 Cross-reactivities of CL mAb and RAC mAb against β -adrenergic agonists

化合物 Chemicals	CL mAb 交叉反应率 CR	RAC mAb 交叉反应率 CR
克伦特罗 Clenbuterol	100	<0.05
莱克多巴胺 Ractopamine	<0.05	100
沙丁胺醇 Salbuterol	0.8	<0.05
班布特罗 Bambuterol	<0.05	<0.05
西马特罗 Cimatrol	<0.05	<0.05
特布他林 Terbutaline	<0.05	<0.05
马布他罗 Mabuterol	<0.05	<0.05
多巴酚丁胺 Dobutamine	<0.05	9.6
异丙肾上腺素 Isoprenaline	<0.05	<0.05
肾上腺素 Epinephrine	<0.01	<0.01
去甲肾上腺素 Norepinephrine	<0.01	<0.01

2.4 胶体金免疫层析方法的优化

2.4.1 胶体金颗粒的特征 胶体金的制备是还原反应,同样温度和反应时间时,胶体金颗粒的直径大小与柠檬酸三钠数量成反比。制备的胶体金颗粒有 40、25 和 15 nm 等不同大小,直径越小,与抗体偶联后在溶液中的扩散能力越强,试纸条灵敏度越高。本试验制备的胶体金溶液肉眼观察时清亮透明;UV-vis 紫外扫描时,最大吸收峰为 520 nm;透射电镜扫描时,胶体金颗粒成单分散系,大小均匀,直径为 $(15 \pm 1.2) \text{ nm}$ ($n=20$)。因此,胶体金溶液能满足检测要求,为试纸条的研制打下良好的基础。

2.4.2 金标抗体的偶联 金标抗体的偶联率和稳定性对免疫检测系统有重要影响,稍有改变会降低试纸条的灵敏度,而抗体用量和 pH 是影响金标抗体偶联的重要因素。一般情况下,pH 在抗体等电点或稍高时,胶体金偶联抗体的数量最多。但过高的偶联率会使金标抗体与检测抗原结合物的解离常数下降,空间位阻效应上升,不利于标准品的取代反应,从而降低了试纸条的灵敏度。本文采用“二维阵法”,选择 pH 9.0 左右时,1 mL 胶体金的最佳

标记蛋白量为 C1D3E5 mAb 8 μg (或 R2C1A6 mAb 12 μg),试验效果理想。

2.4.3 其它理化条件的优化 NC 膜、喷膜浓度和封闭液等理化因素对试纸条质量有重要影响。

本试验比较了 AE99、AE100 和 FF85 等不同种类的 NC 膜,结果发现 FF85 膜显色集中,条带均匀,适合本文试纸条的研制。

适宜的喷膜浓度能缩短阴性样品的显色时间,并且阳性样品 T 线和 C 线显色差异显著。为保证检测线显色清晰,提高灵敏度,避免假阳性现象,CL-strip 和 RAC-strip 偶联垫上灌注的金标抗体量分别确定为 60 和 100 μL ,研制 Multi-strip 时,2 种金标抗体要灌注在不同的位点。研制单残留试纸条时,检测抗原 CL-OVA 和 RAC-BSA 分别用 CBS 和 PBS 缓冲液稀释,终浓度确定为 0.2 和 0.1 $\text{mg} \cdot \text{mL}^{-1}$;研制 Multi-strip 时,2 条 T 线间距为 2 mm。

NC 膜的封闭过程可以增加膜的流动性,从而提高胶体金试纸条的稳定性和灵敏度,减少背景干扰。作者筛选了 BSA、OVA、脱脂奶粉和酪蛋白等几种不同的封闭液,最终选择 1% BSA 的 PBS 缓冲

液作为 NC 膜的封闭液。

2.5 胶体金免疫层析试纸条的检测性能

用含 30% 甲醇的 PBS 配制 $0 \sim 20 \text{ ng} \cdot \text{mL}^{-1}$ 不同浓度的 CL 或 RAC 标准品溶液,以检测线红色条带基本消失为依据判定为阳性,观察单残留免疫层析试纸条的灵敏度,确定 CL-strip 和 RAC-strip 的目测检测限分别为 1 和 $2 \text{ ng} \cdot \text{mL}^{-1}$,检测时间为 $3 \sim 5 \text{ min}$ 。

在预试验的基础上,配制 $0, 0.5, 1.0$ 和 $2.0 \text{ ng} \cdot \text{mL}^{-1}$ CL 标准液, $0, 1.0, 2.0$ 和 $4.0 \text{ ng} \cdot \text{mL}^{-1}$ RAC 标准液, $0/0, 0.5/1.0, 1.0/2.0$ 和 $2.0/4.0 \text{ ng} \cdot \text{mL}^{-1}$ CL/RAC 混合标准液,验证 Multi-strip 的有效性和灵敏度,每次检测 6 个重复,结果见图 4。当 CL 标准液滴加到试纸条样品垫上的浓度 $\geq 1.0 \text{ ng} \cdot \text{mL}^{-1}$ 时,CL 检测线红色条带基本消失,而

RAC 检测线和 C 线始终出现红色条带(图 4A);当 RAC 的浓度 $\geq 2.0 \text{ ng} \cdot \text{mL}^{-1}$ 时,RAC 检测线红色条带基本消失,而 CL 检测线和 C 线始终出现红色条带(图 4B);当 CL/RAC 混合标样浓度 $\geq 1.0/2.0 \text{ ng} \cdot \text{mL}^{-1}$ 时,CL 和 RAC 检测线红色均消失(图 4C)。由此确定 Multi-strip 的 CL 和 RAC 目测检测线分别为 1 和 $2 \text{ ng} \cdot \text{mL}^{-1}$,与单残留检测试纸条相同。这说明 CL 标准品(或 RAC 标准品)能与偶联垫上 C1D3E5 mAb(或 R2C1A6 mAb)特异性结合,彼此间无竞争性干扰,也说明多残留检测试纸条的研制是可行的。

本文多残留检测试纸条的检测时间为 $5 \sim 8 \text{ min}$,比单残留试纸条慢 $2 \sim 3 \text{ min}$,这可能是不同的金标抗体混合物和检测抗原迟滞了膜的流动性。



A. CL/RAC 浓度: $0/0, 0.5/0, 1.0/0$ 和 $2.0/0 \text{ ng} \cdot \text{mL}^{-1}$; B. CL/RAC 浓度: $0/0, 0/1.0, 0/2.0$ 和 $0/4.0 \text{ ng} \cdot \text{mL}^{-1}$; C. CL/RAC 浓度: $0/0, 0.5/1.0, 1.0/2.0$ 和 $2.0/4.0 \text{ ng} \cdot \text{mL}^{-1}$

A. CL/RAC concentrations: $0/0, 0.5/0, 1.0/0$ and $2.0/0 \text{ ng} \cdot \text{mL}^{-1}$; B. CL/RAC concentrations: $0/0, 0/1.0, 0/2.0$ and $0/4.0 \text{ ng} \cdot \text{mL}^{-1}$; C. CL/RAC concentrations: $0/0, 0.5/1.0, 1.0/2.0$ and $2.0/4.0 \text{ ng} \cdot \text{mL}^{-1}$

图 4 CL 和 RAC 多残留试纸条的检测性能

Fig. 4 Characteristics of Multi-strip assay for CL and RAC

稳定性:待测试纸条在保存期内其外观和准确性等均未发生变化,与新制备的试纸条检测结果完全一致,说明在 $4 \text{ }^{\circ}\text{C}$ 冰箱中可密封保存 12 个月以上。

重复性:不同批次的平行试纸条在不同温度和不同浓度下检测结果差异不明显,重复性良好。

特异性:用 $0 \sim 20 \text{ ng} \cdot \text{mL}^{-1}$ 不同浓度的 β -兴奋剂药物做特异性检测,结果均无交叉反应。

基质效应性:将 GC-MS 检测呈阴性的猪尿、饲料和猪肉依 1.5 样品前处理方法进行添加检测试验,结果表明试纸条抗基质干扰能力强,可用于实际样品的检测。但样品前处理后,基质分别稀释了 0.2 和 2 倍,因此试纸条在猪尿、饲料和猪肉中的检测线分别

确定为 $2.0 \text{ ng} \cdot \text{mL}^{-1}$ (CL-strip)、 $4.0 \mu\text{g} \cdot \text{kg}^{-1}$ (RAC-strip) 和 $2.0/4.0 \mu\text{g} \cdot \text{kg}^{-1}$ (Multi-strip)。

2.6 真实样品的检测

将 2011 年 3 月份采自河南孟州某猪场的 3 种样品用 Multi-strip 检测,结果发现 138 份猪尿中,CL 阳性 5 份;90 份猪肉中,CL 阳性 3 份;6 个饲料样品中,CL 和 RAC 阳性各 1 份。

阳性样品同时用单残留检纸条和 icELISA 检测,结果见表 2。3 种方法检测结果高度一致,无假阳性和假阴性案例。阳性样品用 GC-MS 确证法进行准确定量^[5],其检测值与免疫学检测结果相比较,差异不显著(表 2)。因此,研制的 Multi-strip 可用于实际样品检测。

表 2 单残留试纸条、多残留试纸条、icELISA 和气质联用检测 CL 和 RAC 残留

Table 2 CL and RAC analysis by individual strip, Multi-strip, icELISA and GC-MS

样品 Samples	编号 No.	多残留试纸条 Multi-strip		单残留试纸条 Individual-strip		间接竞争 ELISA icELISA/(ng · mL ⁻¹)		气质联用 GC-MS/(ng · mL ⁻¹)	
		CL	RAC	CL	RAC	CL	RAC	CL	RAC
猪尿 Urine	U2	+a	- ^b	+	-	2.35	-	2.21	-
	U9	+	-	+	-	1.68	-	1.75	-
	U23	+	-	+	-	3.24	-	3.06	-
	U69	+	-	+	-	5.06	-	4.95	-
	U92	+	-	+	-	2.22	-	2.14	-
猪肉 Pork	P14	+	-	+	-	3.77	-	3.67	-
	P26	+	-	+	-	4.52	-	4.58	-
	P77	+	-	+	-	2.98	-	2.86	-
饲料 Feed	F1	+	-	+	-	7.16	-	6.87	-
	F5	-	+	-	+	-	9.08	-	8.85

^a. 阳性; ^b. 阴性

^a. Positive result; ^b. Negative result

3 讨论

3.1 胶体金的制备

胶体金是氯金酸在还原剂作用下,聚合成特定大小的金颗粒,并由于静电作用成为一种稳定的胶体状态。制备颗粒均匀、分散度好的胶体金在试验中非常关键,若金颗粒直径太大,会产生空间位阻,蛋白结合后不稳定,不易保存,影响试纸条的稳定性和重复性;若胶体金颗粒太小,反应结合率低,胶体金标记物易解离和沉淀而产生金标扩散不完全、反应区底色过深和假阳性现象。常见的胶体金制备方法有白磷还原法、抗体血酸还原法、柠檬酸三钠还原法、乙醇超声波还原法、硼氢化钠还原法和放射性胶体金制备法等,但最经典的方法还是 Frens 于 1973 年创立的柠檬酸钠还原法。作者同样选用柠檬酸钠还原法,制备出大小均匀,直径为 15 nm 的胶体金颗粒,效果良好。此外,胶体金制备时的水质、器皿清洁、还原剂加入量和加入次数、氯金酸溶液的初始沸腾时间和继续加热反应时间等因素都直接影响胶体金的质量。

3.2 胶体金标记抗体的制备

胶体金标记实质上是抗体蛋白等生物大分子被吸附到胶体金颗粒表面的包被过程,利用它在碱性环境中带负电荷的性质,与蛋白质分子或其他生物

大分子的正电荷基团借静电吸引而形成牢固结合。胶体金标记的 2 个关键环节是 pH 和蛋白最佳标记量的确定。当胶体金 pH 接近和稍高于蛋白质的等电点时,抗体在金颗粒表面的吸附量最大,二者容易形成牢固的结合物。如果胶体金的 pH 低于蛋白质等电点,则会导致标记不全,结合率低,降低试纸条的灵敏度。因此本文预先用 0.1 mol · L⁻¹ K₂CO₃ 调节胶体金的 pH 至 9.0,然后确定最佳标记抗体量。由于金标抗体溶液中游离的蛋白容易抢先与标记位点结合,出现假阴性结果;而蛋白含量低时会出现游离的胶体金颗粒,最终影响检测灵敏度和标记物的稳定性。因此本文采用“二维阵法”测定最小抗体用量,并以此为基础增加 20% 抗体量,即为胶体金偶联抗体适合浓度。

3.3 试纸条装配材料的准备

硝酸纤维素膜(NC 膜)是胶体金免疫层析试纸中极为关键的一个组成部分。在选择 NC 膜时通常考虑 3 个方面:孔径、爬速与蛋白质的结合能力,其中膜孔径大小与蛋白结合能力密切相关。一般来说,膜孔径越大,爬速就越快,抗体和抗原的结合时间也相应缩短;反之,膜孔径较小时抗原抗体反应充分,灵敏度提高,但反应时间延长,发生非特异性结合的概率大大增加。因此必须根据自己的试验要求选择合适的 NC 膜。

样品垫和偶联垫一般都选择玻璃纤维膜,因为玻璃纤维膜释放快,蛋白保留率低,并且能对样品起到过滤作用。本试验使用进口的 Class33 玻璃纤维膜作为样品垫,其吸水性好,金标抗体释放快,残留少,试纸条显色较深,能满足试验的要求。同时,样品垫和偶联垫的预处理也十分重要。本试验在偶联垫中加入了蔗糖,因其水溶性较好,能够使金标抗体充分释放;同时在样品垫中加入了 2% BSA,能有效保护抗体标记物,延长了试纸条的有效期。

4 结 论

本研究利用胶体金作为示踪物,采用抗体标记模式,成功研制了同时检测克伦特罗和莱克多巴胺的多残留胶体金免疫层析试纸条。该试纸条具有快速、准确、灵敏等优点,可凭肉眼在 5~8 min 判定结果,操作简单,普通的养殖户都可现场操作。与单残留试纸条相比,该试纸条可同时检测 2 种标的物,检测效率高;与 ELISA 试剂盒相比,该试纸条所有试剂融合在一起,缩短了检测时间;与 GC-MS 等理化方法相比,该试纸条不需要昂贵的仪器设备、专业的技术人员和繁琐的样品前处理过程。因此,多残留胶体金免疫层析试纸条的研制具有广阔的市场前景和应用价值。但由于胶体金试纸条是定性检测,在进行准确定量时,需要与 ELISA 和理化检测方法相结合。

参考文献:

- [1] 申屠芬琴,强致懿,张素霞,等. 猪肾脏等组织中盐酸莱克多巴胺的 HPLC 检测方法及其残留消除 [J]. 畜牧兽医学报, 2007, 38(6):589-594.
- [2] 张海棠,王自良,邓瑞广,等. 抗莱克多巴胺单克隆抗体杂交瘤细胞株的建立及其免疫学特性鉴定 [J]. 食品科学, 2009, 30(3):175-179.
- [3] TURBERG M P, RODEWALD J M, COLEMAN M R. Determination of ractopamine in monkey plasma and swine serum by high-performance liquid chromatography with electrochemical detection [J]. *J Chromatogr B Biomed Appl*, 1996, 675(2):279-285.
- [4] PESSER A C, DICKSON L C, MACNEIL J K, et al. Determination of beta-agonists in liver and retina by liquid chromatography-tandem mass spectrometry [J]. *J NOAC Int*, 2005, 88(1):61-69.
- [5] 应永飞,皮雄娥,吴平谷,等. 气相色谱-质谱法同时测定动物尿样中莱克多巴胺和克伦特罗 [J]. 质谱学报, 2006, 27(2):74-78.
- [6] XU T, WANG B M, SHENG W, et al. Application of an enzyme-linked immunosorbent assay for the detection of clenbuterol residues in swine urine and feeds [J]. *J Environ Sci Health B*, 2007, 42(2):173-177.
- [7] ZHANG G P, WANG X N, YANG J F, et al. Development of an immunochromatographic lateral flow test strip for detection of β -adrenergic agonist clenbuterol residues [J]. *J Immunol Methods*, 2006, 312(1-2):27-33.
- [8] LI X, ZHANG G P, DENG Y G, et al. Development of rapid immunoassays for the detection of ractopamine in swine urine [J]. *Food Addit Contam*, 2010, 27(8):1096-1103.
- [9] WANG Z, ZHU Y, DING S, et al. Development of a monoclonal antibody-based broad-specificity ELISA for fluoroquinolone antibiotics in foods and molecular modeling studies of cross-reactive compounds [J]. *Anal Chem*, 2007, 79(12):4471-4483.
- [10] ZHU Y, LI L, WANG Z, et al. Development of an immunochromatography strip for the rapid detection of 12 fluoroquinolones in chicken muscle and liver [J]. *J Agric Food Chem*, 2008, 56(14):5469-5474.
- [11] SHIM W B, DZANTIEV B B, EREMIN S A, et al. One-step simultaneous immunochromatographic strip test for multianalysis of ochratoxin A and zearalenone [J]. *J Microbiol Biotechnol*, 2009, 19(1):83-92.
- [12] JIANG J Q, ZHANG H T, FAN G Y, et al. Preparation of monoclonal antibody based indirect competitive ELISA for detecting 19-nortestosterone residue [J]. *Chinese Sci Bull*, 2011, 56(25):2698-2705.
- [13] JIANG J Q, WANG Z L, ZHANG H T, et al. Monoclonal antibody-based ELISA and colloidal gold immunoassay for detecting NT residue in animal tissue [J]. *J Agric Food Chem*, 2011, 59(18):9763-9769.

(编辑 白永平)