

酶联免疫技术在生猪盐酸克伦特罗检测中的应用

许春光 杨克军

(深圳市龙岗区动物防疫监督所 广州 518116)

摘要 盐酸克伦特罗被一些养猪户用来提高猪的瘦肉率。但它在猪肉及内脏中的残留给摄食的人造成极大的危害。利用 Randox 公司产 ELISA 检测试剂盒,结合 ELX800 通用酶标仪对 442 份生猪尿样进行检测,发现阳性样品 7 份(含量 $>5\text{ng/mL}$),与 GCMS 检测结果一致。另配制浓度为: 50ng/mL 、 25ng/mL 、 20ng/mL 、 10ng/mL 、 5ng/mL 、 2.5ng/mL 的标准溶液,经同样方法检测均能得到较好的符合率。说明该方法具有较高的灵敏度和特异性,特别适于大批量盐酸克伦特罗尿样的定性和定量检测。

关键词 盐酸克伦特罗 ELISA 试剂盒 ELX800 通用酶标仪 GCMS 法

盐酸克伦特罗(clenbuterol)俗名“瘦肉精”,是一种肾上腺素受体激动剂,分子式: $\text{C}_{12}\text{H}_{16}\text{Cl}_2\text{H}_2\text{O}\cdot\text{HCl}$ 。20 世纪 80 年代被广泛应用到畜禽生产中,用来提高瘦肉率,近年来畜产品中盐酸克伦特罗的残留对人类健康造成的危害和对生态食物链造成的破坏已经引起高度的重视。人如果食用盐酸克伦特罗过量的肉品,就会出现心跳加快,血压增高,心悸,头痛,恶心、呕吐、手颤等症状,严重者出现抽搐,晕厥,对患者有高血压、心脏病、甲亢、前列腺肥大的患者危害更大。因此农业部、国家质检总局等部门发文严禁禁止在动物生产中使用盐酸克伦特罗。目前国内有些地区还在非法使用盐酸克伦特罗,并发生多起中毒事件。国家对饲料和肉品中的盐酸克伦特罗进行严密的监控,卫生检验及市场监管部门主要检测屠场生猪尿液、市场上猪肉内脏组织中的残留情况。而由于尿液不需要经过特别的处理就可以进行检测,所以尿液是检测盐酸克伦特罗的最常用的活体样品。

检测盐酸克伦特罗残留的方法目前主要有四种,即高效液相色谱法(HPLC),气相色谱-质谱法(GCMS),毛细管区带电泳法(CE)和免疫分析技术(IA)。ELISA 作为 IA 技术的一种,是目前常规使用的检测方法,在酶标仪帮助下依据比耳(Beer)定律测定微量反应板中各孔的光吸收值,测定出各孔中溶液的浓度,以此计算出被测样品中“瘦肉精”的含量。下面是我们利用 ELX800 通用酶标仪检测生猪尿液中“瘦肉精”含量的试验。

1 材料与方

1.1 仪器和试剂

ELISA 试剂盒为英国 Randox 提供:标准品为英

国 Randox、国家生物物品检定所提供。

BioTek 公司产的 ELX800 通用酶标仪:设置要点:①滤光片波长为 450nm ;②计算曲线为试剂盒要求的相应反对数曲线;③标准品位置、重复数、浓度、读数方式及起始位置应与酶标板上标准样品及待测样品的排列方式一致。

1.2 样本来源

442 份宰前猪尿样品分别来自湖南省湘潭、河南省驻马店、江西萍乡等地;60 份宰后猪尿样。另利用阴性尿样配制不同浓度的盐酸克伦特罗标准液,浓度分别为: 50ng/mL 、 25ng/mL 、 20ng/mL 、 10ng/mL 、 5ng/mL 、 5.65ng/mL 、 2.5ng/mL 。

1.3 方法

1.3.1 ELISA 检测 应用英国 Randox ELISA 检测试剂盒检测猪尿。ELISA 法原理:微量反应板各孔中包被有盐酸克伦特罗的抗体,标准试剂或样品中的盐酸克伦特罗与辣根过氧化物酶标记的盐酸克伦特罗共轭物竞争包被抗体上的结合位点。经过一定时间反应后洗涤微量反应板并加入酶的底物,避光显色一定时间加入终止液终止显色反应。在酶标仪上利用 450nm 滤光片检测出微量反应板上各孔的吸光度值。

1.3.2 比较试验 上述被检样品盐酸克伦特罗含量 $\geq 5\text{ng/mL}$ 的送深圳市肉检所运用 GCMS 法进行检测。各种方法所得结果以 $\geq 5\text{ng/mL}$ 为阳性。

1.3.3 结果计算 绘制标准制品对 $1\text{g}10\text{X}$ (标准浓度)的吸光度曲线。然后从标准曲线上读取待测样品的吸光度。将从标准曲线上得到的结果乘以尿液的稀释倍数 5 即得尿中盐酸克伦特罗的含量(单位为 ng/mL)。其中试剂盒 GB1418 对尿液中盐酸克伦特罗的检出限为 0.3ng/mL 。

1.4 试验条件

1.4.1 试样的制备 将待测尿样 4000rpm 离心 5min, 取上清液用洗涤缓冲液作 45 倍稀释。使用前回复至室温 19~25℃。将标准品及稀释的待测样品各 25μL 分别加入到微量反应板的不同孔中, 每一标准品及待测样品均作重复。

1.4.2 样品检测 稀释好的酶标记共轭物 100μL 加入到微量反应板所有孔中, 轻轻震荡反应板, 然后室温孵育 1h。然后用洗涤缓冲液在 15min 内洗涤 6 次, 最后一次洗涤后倒出其中洗涤液, 在滤纸上拍干线条液体。立即在各孔中加入 125μL 底物溶液, 轻轻震荡后室温避光反应 20min。各孔中加入 100μL 终止液终止显色反应, 孔中的颜色会由蓝变黄。10min 内在 450nm 波长光源条件下检测各孔的吸光度值。根据 EL800 酶标仪输出的浓度计算尿液原液中盐酸克伦特罗的含量。

表 1 ELISA 法对标准对照样品结果

标准样品	吸光度值	标准品浓度	计算浓度	CV%
1	第一孔 1.642	0.000	0.003	4.546
	第二孔 1.751		0.000	
	平均数 1.696		0.001	
2	第一孔 1.473	0.090	0.088	0.557
	第二孔 1.462		0.092	
	平均数 1.468		0.090	
3	第一孔 1.226	0.200	0.215	1.904
	第二孔 1.259		0.188	
	平均数 1.242		0.200	
4	第一孔 1.660	0.430	0.431	0.071
	第二孔 1.061		0.429	
	平均数 1.060		0.430	
5	第一孔 0.807	0.880	0.829	4.181
	第二孔 0.760		0.952	
	平均数 0.784		0.88	
6	第一孔 0.297	4.600	4.598	0.074
	第二孔 0.297		4.602	
	平均数 0.297		4.600	

2 结果与讨论

2.1 检测结果

(上接第 45 页)

参考文献

1 李效白. 砷化镓微波功率场效应晶体管及其集成电路, 北京: 科学出版社, 1998

经检测 442 份尿样中有 7 份尿样呈盐酸克伦特罗阳性反应, 其浓度依次为: 11ng/mL、18.8ng/mL、6.2ng/mL、13.6ng/mL、6.5ng/mL、10.5ng/mL、8.3ng/mL。

2.2 讨论

2.2.1 ELISA 法其中一试剂盒标准对照样品吸光度值、标准浓度及误差分析(见表 1), 可见该试剂盒定量检测结果是较接近真实值的。

2.2.2 阳性样品 ELISA 试剂盒检测结果与 GC/MS 得到结果比较(见表 2)。

表 2 两种测量结果的比较 单位: ng/mL

阳性样品	1	2	3	4	5	6	7
ELISA 法	11	18.8	6.2	13.6	6.5	10.5	8.3
GC/MS	+	+	+	+	+	+	+

2.2.3 对自配标准液的检测(见表 3)。

表 3 对自己标准液的检测结果

标准样品(ng/mL)	50	25	20	10	5	2.5
第一次(ng/mL)	36.87	23.09	19.03	9.99	5.1	1.94
第二次(ng/mL)	40.11	25.02	18.09	9.8	4.79	1.62
平均误差(%)	23	3.78	7.2	1.05	1.1	28.8

从对标准液的检测结果可以看出, Randox 检测试剂盒对同一样品检测的重现性较好, 在标准浓度 5~25ng/mL 范围内检测结果与标准浓度误差小, 误差范围为 1.05%~7.2%, 在 ≥50ng/mL 和 ≤2.5ng/mL 浓度范围时误差突然放大。原因在于试剂盒标准对照浓度范围为 0~4.6%, 乘以稀释倍数 5, 其检测范围在 0~23ng/mL 之间应比较准确。

3 结论

从本次试验可以看出用 ELISA 试剂盒检测盐酸克伦特罗, 具有较高的灵敏度和特异性, 特别适于大批量尿液样品中盐酸克伦特罗的定性定量检测, 能较好地满足基层试验室对生猪盐酸克伦特罗的检测。

2 陆家和, 陈长彦. 表面分析技术, 北京: 电子工业出版社, 1987

3 秦超, 查良镇, 桂东等. 硅中硼的 SIMS 定量分析, 真空科学与技术, 1998(增刊): 181~187

Quantitative SIMS analysis of copper in GaAs

He Youjin Ma Nongnong

(China Electronics Technology Group Corporation No. 46 Research Institute Tianjin 300192)

Abstract Quantitative SIMS analysis of copper in GaAs is an important technique to control the concentration of copper impurity in GaAs. The method to analyze copper concentration in GaAs quantitatively with relative sensitivity factor (RSF) was introduced.

Key words SIMS Relative Sensitivity Factor (RSF) Quantitative analysis