

- [J]. 当代化工, 2007, 36(1): 89-91.
- [6] 鲁秋宏, 曹叶中. 食品中甜蜜素检测方法的改进[J]. 内蒙古农业科技, 2010(1): 62-63.
- [7] 郝文, 孙维, 唐岩. 食品中甜蜜素的毛细管气相色谱法[J]. 中国卫生检验杂志, 2005, 15(11): 1341.

实验技术与方法

时间分辨荧光免疫分析法测定莱克多巴胺

王超¹, 李志雄¹, 林冠峰², 吴英松^{1,2}

- (1. 中山大学达安基因股份有限公司, 广东 广州 510663;
2. 南方医科大学生物技术学院, 广东 广州 510515)

摘要:目的 用时间分辨荧光免疫分析(TRFIA)方法测定莱克多巴胺(ractopamine, RAC)。方法 采用 RAC 与牛血清白蛋白(BSA)的偶联物(RAC-BSA)包被 96 孔板为固相抗原, 与样品中游离的 RAC 共同竞争 Eu^{3+} 标记的抗 RAC 抗体, 用直接竞争法检测尿样中的 RAC, 并对此方法进行方法学评价。结果 分析灵敏度为 0.01 ng/ml; 剂量反应曲线线性相关系数绝对值 $|r| = 0.9985$; 回收率为 91.6% ~ 110.0%; 与多巴酚丁胺、异舒普林、沙美特罗、非诺特罗、克伦特罗、特布他林和沙丁胺醇 7 种药物的交叉反应率分别小于 0.8%、0.1%、0.1%、0.05%、0.01%、0.01% 和 0.01%; 分析内相对标准偏差为 2.38% ~ 3.90%; 分析间相对标准偏差为 3.68% ~ 5.43%; 与进口 ELISA 试剂比较, 检测结果相关系数 $r = 0.928$ 。结论 莱克多巴胺时间分辨荧光免疫分析法灵敏度比 ELISA 分析法更高、稳定性更好, 具有良好的应用前景。

关键词: 莱克多巴胺; 时间分辨荧光免疫分析法; 免疫检验; 尿液; 食品安全

中图分类号: S852.43 文献标识码: A 文章编号: 1004-8456(2011)05-0438-04

Test ractopamine with the method of time-resolved fluoroimmunoassay

Wang Chao, Li Zhixiong, Lin Guanfeng, Wu Yingsong

(Da An Gene Co., Ltd. of Sun Yat-sen University, Guangdong Guangzhou 510663, China)

Abstract: Objective To test ractopamine with the method of time-resolved fluoroimmunoassay (TRFIA) for the determination of. **Methods** RAC-BSA was coated by physical adsorption onto a 96 well microtitre plate, which was then competed with RAC in the sample for limited quantity of anti-RAC antibody labeled by Eu^{3+} . Ractopamine in urine could be determined by direct competition method. **Results** The assay sensitivity of the method was 0.01ng/ml. The correlation coefficient of dose-response curve was 0.998 5. The recovery rate was 91.6%-110.0%. The cross reaction with dobutamine, isoxsuprine, salmeterol, fenoterol, clenbuterol, terbutaline and salbutamol was less than 0.8%, 0.1%, 0.1%, 0.05%, 0.01%, 0.01% and 0.01%, respectively. The variation coefficient of intra-assay was 2.38%-3.90%. The variation coefficient of inter-assay was 3.68%-5.43%. Compared with the imported RAC-ELISA kit, the correlation coefficient of the determined results was 0.928. **Conclusion** Compared with ELISA, the time-resolved fluoroimmunoassay for ractopamine offered higher sensitivity and good stability, and had a good prospect for application.

Key words: Ractopamine; time-resolved fluoroimmunoassay; immunoassay; urine; food safety

莱克多巴胺属于 β -类肾上腺素受体兴奋剂。该类药物添加于禽畜饲料中, 可加快畜禽的生长速度, 降低胴体脂肪含量, 使制造脂肪的养分转化为

肌肉蛋白, 从而提高瘦肉率和饲料报酬。当人类食用了含莱克多巴胺残留的动物内脏和肉品后, 常造成急性或慢性食物中毒, 中毒者表现为心慌、心跳加快、手颤、头晕等症状^[1-2]。近年来, 莱克多巴胺的非法使用现象日趋严重, 有必要对其检测方法进行研究。

目前莱克多巴胺的检测方法有很多种, 主要为色谱法和免疫分析法。色谱法如高效液相色谱法

收稿日期: 2011-03-07

基金项目: 广州抗体工程技术中心第一期建设计划(2005Z1-E4031)

作者简介: 王超 男 项目主管

通信作者: 吴英松 男 教授 硕士生导师 研究方向为分子诊断和抗体工程 E-mail: yingsongwu@hotmail.com

(HPLC)、气相色谱-质谱联用法(GC-MS)等,需要昂贵的仪器设备和熟练的专业人员,繁琐费时且费用高,不能满足实际检测工作的需求^[3-5]。利用免疫分析技术检测莱克多巴胺是我国近年来研究的热点,市场上现有的检测产品主要是ELISA方法的试剂,虽然操作简便且具有较高的特异性,但存在灵敏度低、稳定性差等缺点^[6]。该类试剂主要依赖进口,价格昂贵,在一定程度上限制了它的推广应用。

本文参考牛尿 β -兴奋剂的双标记时间分辨荧光免疫分析(TRFIA)检测^[7]和TRFIA法检测猪的肌肉和肝脏中RAC^[8]等文献,建立了一种利用时间分辨荧光免疫分析技术检测猪尿中莱克多巴胺含量的方法,并对其方法进行方法学评价^[9],探讨其实际应用的可行性。

1 材料与方法

1.1 试剂

莱克多巴胺为德国Dr. Ehrenstorfer公司产品;用 Eu^{3+} 标记的RAC多克隆抗体为英国RANDOX公司产品;戊二酸酐(纯度97%)、N,N-二甲基甲酰胺(DMF)、1,4-二氧六环、正三丁胺为美国ACROSORGANICS公司产品;氯甲酸异丁酯为日本东京化工株式会社产品; Eu^{3+} 标记盒为PerkinElmer公司产品;牛血清白蛋白(BSA)为Sigma公司产品;Sephadex G-25M、Sephadex G-50为Pharmacia产品;96孔微孔板为厦门云鹏公司产品;其他试剂均为国产分析纯。

1.2 样品

猪尿液样本来源于东莞动物防疫监督所。

1.3 仪器

半自动VICTOR 1420荧光检测仪为PerkinElmer公司产品。

1.4 RAC-BSA抗原的制备

参照文献^[10]的方法。

1.5 参考标准品的制备

用含0.2% BSA, 0.05% 吐温-20, 50 mmol/L pH7.4的PBS缓冲液将RAC配制成0.02、0.10、0.50、2.50和12.50 ng/ml系列标准溶液。

1.6 固相包被板的制备

用50 mmol/L pH9.6的碳酸盐缓冲液将包被抗原RAC-BSA稀释至5 $\mu\text{g}/\text{ml}$,然后以每孔200 μl 的量加入到96孔微孔板中,4 $^{\circ}\text{C}$ 孵育过夜,弃去包被液,加入封闭液(1%去金属离子BSA),每孔250 μl ,37 $^{\circ}\text{C}$ 孵育2 h,弃去封闭液,真空抽干,-20 $^{\circ}\text{C}$ 冷冻保存。

1.7 Eu^{3+} 标记抗体的制备

将1 mg待标记抗体加入到带有滤膜的离心管中,以8 000 r/min离心5 min。用100 mmol/L pH9.3的碳酸盐缓冲液重复洗涤6次后,将250 μl 标记抗体和0.2 mg铕标记试剂充分混匀,于4 $^{\circ}\text{C}$ 过夜。

1.8 Eu^{3+} 标记物的纯化

将 Eu^{3+} 标记抗体加入到Sephadex G-50层析柱(1.9 cm \times 60 cm)中,用含0.9% NaCl的50 mmol/L Tris-HCl洗脱液洗脱。收集流出液(1 ml/管),逐管测量吸光值($A_{280\text{nm}}$),合并峰管。合并后根据 Eu^{3+} 标记试剂盒说明书提供的方法测定并计算抗体标记率和蛋白回收率。

1.9 分析步骤

1.9.1 样品处理

尿样以4 000 r/min离心5 min,用生理盐水稀释10倍后测定。

1.9.2 测定

取RAC-BSA包被板条,加入50 μl 的RAC参考标准品或处理好的样品到各自的微孔中,加50 mmol/L pH7.4的PBS稀释的 Eu^{3+} 标记抗RAC抗体100 μl ,室温振荡孵育30 min,用含0.1%吐温-20的50 mmol/L pH7.8的Tris-HCl洗涤液洗6次。加200 μl 增强液,振荡孵育5 min后,用半自动荧光检测仪进行检测。

2 结果

2.1 RAC-BSA抗原浓度

偶联物经Sephadex G-25M层析柱提纯,用紫外吸收法测得偶联物浓度为8 mg/ml。

2.2 Eu^{3+} 标记率及蛋白回收率

Eu^{3+} 标记抗体经Sephadex G-50层析,收集第1洗脱峰,根据PerkinElmer公司提供的 Eu^{3+} 标准为参考, Eu^{3+} 标记抗体第一洗脱峰的 Eu^{3+} 含量为20.14 $\mu\text{mol}/\text{L}$,蛋白质含量为5.1 $\mu\text{mol}/\text{L}$,即平均每个免疫球蛋白分子上标记了3.9个 Eu^{3+} 。纯化后蛋白回收率为81.6%。

2.3 剂量-反应曲线

各参考标准品浓度与荧光值用Log-Logit进行数学模型拟合,曲线方程为 $y = -0.39760 - 1.48116x$,剂量-反应曲线线性相关系数绝对值 $|r| = 0.9985$ (图1),表明本试剂具有良好的剂量-反应线性关系。

2.4 灵敏度

分别以参考标准品A和正常尿样测定均值减去其2倍标准差所得的荧光值,代入标准曲线方程求得的分析方法检测下限为0.01 ng/ml,尿液样本

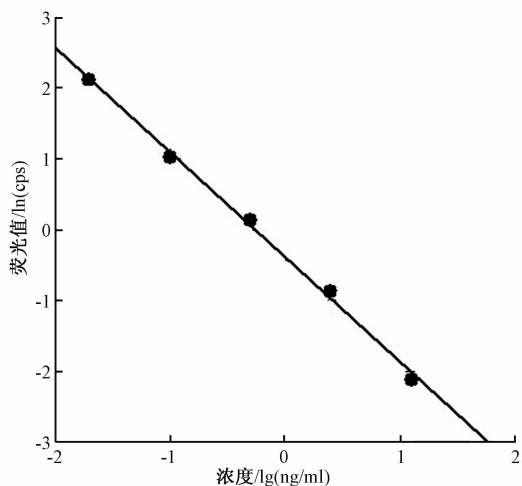


图1 RAC-TRFIA 试剂剂量-反应曲线

Figure 1 Dose-response curve for RAC-TRFIA reagent

检测下限为 0.05 ng/ml,见表 1。

表1 分析灵敏度结果

Table 1 The sensitivity of assay results (n = 20)

样品	平均值 (cps)	标准差 (cps)	分析灵敏度 (ng/ml)
参考标准品 A	172565	6198.32	0.01
正常尿样	160623	9365.62	0.05

2.5 回收率

在 RAC 浓度为 0 和 0.11 ng/ml 尿样 1 ml,分别加入浓度为 0、1.1、11 和 110 ng/ml 的 RAC 0.1 ml,重复测定 5 次,计算回收率。空白平均加标回收率为 97.9%,样品平均加标回收率为 98.3%,表明本试剂具有良好的准确性,见表 2。

表2 猪尿中添加 RAC 回收率检测结果

Table 2 The recovery of standard addition for RAC in porcine urine (n = 5)

样品含量 (ng/ml)	添加含量 (ng/ml)	测定值 (ng/ml)	回收率 (%)
0	0.10	0.11	110.0
0	1.00	0.92	92.0
0	10.00	9.16	91.6
0.10	0.10	0.20	100.0
0.10	1.00	1.07	97.0
0.10	10.00	9.90	98.0

2.6 特异性

向正常尿样添加不同浓度的多巴酚丁胺、异舒普林、沙美特罗、非诺特罗、克伦特罗、特布他林和沙丁胺醇 7 种药物做交叉实验,RAC 的 IC₅₀与这些药物的 IC₅₀的百分比为交叉反应率,见表 3。本试剂与上述 7 种药物交叉反应率均很低,表明抗体特异性良好。

2.7 分析精密度

以样品加标回收率实验中 3 个分析样本为质控,

表3 特异性检测结果

Table 3 Specificity analyses on results

抑制物	半数抑制率浓度 (ng/ml)	交叉反应率 (%)
莱克多巴胺	0.54	100
多巴酚丁胺	>0.68 × 10 ²	<0.80
异舒普林	>0.54 × 10 ³	<0.10
沙美特罗	>0.54 × 10 ³	<0.10
非诺特罗	>1.08 × 10 ³	<0.05
克伦特罗	>0.54 × 10 ⁴	<0.01
特布他林	>0.54 × 10 ⁴	<0.01
沙丁胺醇	>0.54 × 10 ⁴	<0.01

采用直接竞争 RAC-TRFIA 进行测定,各设 10 个重复孔。分析内相对标准偏差为 2.38% ~ 3.90%,平均 3.38%;分析间相对标准偏差为 3.68% ~ 5.43%,平均 4.56%。从分析内与分析间相对标准偏差可以看出本试剂重复性好、精密度高,见表 4 和表 5。

表4 分析内精密度测试结果

Table 4 Intra-assay precision of results (n = 10)

RAC 浓度 (ng/ml)	平均测定浓度 (ng/ml)	标准偏差 (ng/ml)	相对标准偏差 (%)
0.20	0.21	0.005	2.38
1.10	1.05	0.041	3.90
10.10	9.63	0.372	3.86

表5 分析间精密度测试结果

Table 5 Inter-assay precision of results (n = 10)

RAC 浓度 (ng/ml)	平均测定浓度 (ng/ml)	标准偏差 (ng/ml)	相对标准偏差 (%)
0.20	0.20	0.007	3.68
1.10	1.08	0.049	4.57
10.10	9.75	0.529	5.43

2.8 与国外 ELISA 试剂盒比较

采集了 50 份阳性猪尿样,尿样经 HPLC 检测确定为阳性。经本试剂与目前国内使用量较大的德国 R-Biopharm 公司的 ELISA 试剂盒同时进行检测。50 份尿样本试剂可全部检出,其中 11 份尿样 RAC 浓度低于 ELISA 的测量下限,有 39 份尿样的 RAC 浓度在 ELISA 试剂盒的可测范围之内,用统计产品与服务解决方案软件 (Statistical Product and Service Solutions, SPSS) 对该 39 份样品两种试剂检测结果进行相关分析,相关系数 r = 0.928,相关性良好,见表 6。

表6 RAC 不同测试方法的相关性分析

Table 6 The correlation analysis of different determination methods for ractopamine

试剂盒		TRFIA	ELISA
TRFIA	Pearson Correlation	1	0.928 ^a
	Sig. (2-tailed)		0.000
	N	39	39
ELISA	Pearson Correlation	0.928 ^a	1
	Sig. (2-tailed)	0.000	
	N	39	39

注:^a 相关性分析的显著水平为 0.01。

3 讨论

时间分辨荧光免疫分析技术具有灵敏度高、特异性强、稳定性好、测定范围宽和无放射性等优点^[11-13]。其基本原理是利用具有独特荧光特性的镧系元素离子及其螯合物为示踪物,代替荧光物质、酶、同位素、化学发光物质标记抗体、抗原、激素、多肽、蛋白质、核酸探针及生物细胞,待反应发生后,用时间分辨荧光免疫分析检测仪测定反应产物中的荧光强度。根据产物荧光强度和相对荧光强度的比值,判断反应体系中分析物的浓度,从而达到定量分析^[14]。作为一项新兴的超微量标记免疫技术,其发展十分迅速,已被广泛应用于临床诊断试剂的开发,然而在食品安全检测方面的应用却少有报道。

莱克多巴胺已被禁止在畜产品生产过程中使用^[15-16]。欧盟早已明确禁止在食用性动物中使用包括莱克多巴胺在内的所有 β -肾上腺素兴奋剂类药物,我国也于2002年明确将其列入《禁止在饲料和动物饮用水中使用的药物品种目录》。即使极少量的莱克多巴胺残留在食品中也会对人类健康造成危害。为此需要一种灵敏度高、稳定性好的快速检测方法,而时间分辨荧光免疫分析技术正好具备了以上优点。

本文采用TRFIA技术进行RAC检测。其灵敏度和可检测范围较ELISA成倍增加,分析灵敏度可达到0.01 ng/ml,尿液样本检测灵敏度可达到0.05 ng/ml,相比较于德国R-Biopharm公司的ELISA试剂盒的0.6 ng/ml,灵敏度提高了一个数量级。Shen等^[8]报道的TRFIA法检测猪的肌肉和肝脏中RAC灵敏度也达到0.1 $\mu\text{g}/\text{kg}$,可见TRFIA法检测RAC比ELISA法灵敏度上具有明显优势。TRFIA具有独特的荧光特性,特异性荧光的衰变时间极长,为传统荧光的 $10^3 \sim 10^6$ 倍,激发光与发射光之间的Stokes位移可达290 nm,而普通荧光素的Stokes位移仅为28 nm^[13],使得试剂标准曲线漂移小,更提高了试剂的稳定性和准确性。本文在研究过程中还发现,标记抗体和 Eu^{3+} 的标记量的控制非常重要,它们的量直接影响灵敏度和本底值,尤其前者的量更为重要。研究发现:低浓度标记抗体,标记效率高,但本底高;高浓度标记抗体,有助于提高灵敏度和降低本底,但其标记效率有所下降。综上所述,本文建立的RAC-TRFIA法,具有灵敏度高和重复性好等优点,能够满足莱克多巴胺的检测需

求,具有良好的应用价值。

参考文献

- [1] 李俊锁,邱月明,王超,等.兽药残留分析[M].上海:上海科学技术出版社,2002:24-26.
- [2] 吴平谷. β_2 -兴奋剂检测国内外研究进展[J].中国卫生检验杂志,2003,13(2):245-246.
- [3] DICKSON L C, MACNEIL J D, LEE S, et al. Determination of beta-agonist residues in bovine urine using liquid chromatography-tandem mass spectrometry [J]. J AOAC Int, 2005, 88(1):45-46.
- [4] ZHAO Meiping, LIU Yang, LI Yuanzong, et al. Development and characterization of an immunoaffinity column for the selective extraction of bisphenol A from serum samples [J]. J Chromatogr B, 2003, 783(2):401-410.
- [5] WANG Jianping, LI Xiaowei, ZHANG Wei, et al. Development of immunoaffinity sample-purification for GC-MS analysis of ractopamine in swine tissues [J]. Chromatographia, 2006, 64(9-10):613-617.
- [6] 于洪侠,杨曙明.莱克多巴胺残留检测方法研究进展[J].中国兽药杂志,2004,38(11):44-47.
- [7] ELLIOTT C T, BAXTER A, HAASNOOT W, et al. Development of a dual label time-resolved fluoroimmunoassay for the detection of β -Agonists in cattle urine [J]. Food Agr Immunol, 1996, 8(4):219-227.
- [8] SHEN Jianzhong, ZHANG Zhen, YAO Yao, et al. Time-resolved fluoroimmunoassay for ractopamine in swine tissue [J]. Anal Bioanal Chem, 2007, 387(4):1564-1564.
- [9] 吴英松,李明.时间分辨荧光免疫技术[M].北京:军事医学科学出版社,2009:153-160.
- [10] SHELVYER W L, SMITH D J. Development of an immunoassay for the β -adrenergic agonist ractopamine [J]. J Immunoassay, 2000, 21(1):1-23.
- [11] 武学成,何林,周克元.时间分辨荧光免疫分析技术及临床应用[J].医学综述,2006,12(7):434-436.
- [12] 乔艳红,谷泽亮,张瀚,等.乙肝病毒表面抗体 TrFIA 方法的建立及其应用[J].标记免疫分析与临床,2007,14(1):24-26.
- [13] HEMMILÄ I. Lanthanides as probes for time-resolved fluorometric immunoassay [J]. Scand J Clin Lab Invest, 1988, 48(5):389-399.
- [14] 杭建峰,吴英松,李明.时间分辨荧光免疫分析的研究进展及应用[J].热带医学杂志,2004,4(3):340-343.
- [15] SMITH D J, EHRENFRIED K M, DALIDOWICZ J D, et al. Binding of ractopamine HCl to ocular tissues of cattle and turkeys in vivo and to melanin in vitro [J]. J Anim Sci, 2002, 80(11):2931-2941.
- [16] TURBERG M P, MACY T D, LEWIS J J, et al. Determination of ractopamine hydrochloride in Swine and Turkey feeds by liquid chromatography with coulometric detection [J]. J AOAC Int, 1994, 77(4):840-847.