

# 纳米免疫磁珠富集猪肉中的盐酸克伦特罗

李超辉<sup>1,2</sup>, 熊勇华<sup>1,2</sup>, 郭亮<sup>1,2,\*</sup>, 吴科盛<sup>2</sup>, 梁语嫣<sup>2</sup>

(1.南昌大学 食品科学与技术国家重点实验室, 江西 南昌 330047;

2.南昌大学 中德联合研究院, 江西 南昌 330047)

**摘要:**以生物素-链霉亲和素系统为介导,将克伦特罗单克隆抗体与纳米磁珠偶联制备免疫磁珠,建立特异性快速富集猪肉中盐酸克伦特罗的方法。将1mg偶联有23.9 $\mu$ g链霉亲和素(SA)的磁珠与220 $\mu$ g生物素化抗体反应,得到抗体偶联量为77.2 $\mu$ g/mg的免疫磁珠。免疫磁珠最佳吸附、洗脱条件为4mL 0.15mol/L盐酸在剧烈振荡条件下提取1g猪肉匀浆样品中的克伦特罗,提取液中加入0.25mg免疫磁珠在37 $^{\circ}$ C, 200r/min振荡吸附5~10min, 100 $\mu$ L甲醇洗脱磁珠5min,洗脱液用PB稀释10倍后ELISA方法检测。加标实验结果表明,加标量为0.25~2ng/g时回收率大于80%,相对标准偏差为11.9%~15.7%;加标量为5ng/g时回收率降至61.2%,相对标准偏差为7.8%。

**关键词:**克伦特罗; 富集; 纳米磁珠; 猪肉

## Enrichment of Clenbuterol in Pork Using Immunomagnetic Nanobeads

LI Chao-hui<sup>1,2</sup>, XIONG Yong-hua<sup>1,2</sup>, GUO Liang<sup>1,2,\*</sup>, WU Ke-sheng<sup>2</sup>, LIANG Yu-yan<sup>2</sup>

(1. State Key Laboratory of Food Science and Technology, Nanchang University, Nanchang 330047, China;

2. Sino-German Joint Research Institute, Nanchang University, Nanchang 330047, China)

**Abstract:** An immunoextraction method based on anti-clenbuterol (CLE) immunomagnetic nanobeads was developed for the rapid and specific enrichment of CLE in pork. Immunomagnetic nanobeads were prepared by coupling 77.2  $\mu$ g of biotinylated antibodies onto 1 mg of nano-magnetic beads that were coated with 23.9  $\mu$ g of streptavidin. The optimal adsorption and desorption conditions were 1 g of homogenized pork extracted with 4 mL of 0.15 mol/L HCl solution with vigorous shaking. Then, 0.25 mg of magnetic nanobeads were added to the extract and incubated 37  $^{\circ}$ C for 10 min on a shaker (200 r/min). Totally 100  $\mu$ L of methanol was mixed with the immunomagnetic nanobeads for 5 min to desorb CLE. The eluate was diluted 10 times with PBS for ELISA determination. The performance of immunomagnetic nanobeads was evaluated by using CLE-spiked samples. The results indicated that the recovery rate of CLE at spiked levels between 0.25 ng/g and 2 ng/g were more than 80% with relative standard deviation of 11.9% to 15.7%. However, the recovery rate of CLE was decreased to 61.2% with relative standard deviation of 7.8% while the spiked concentration was increased to 5 ng/g.

**Key words:** clenbuterol; enrichment; nanomagnetic bead; pork

中图分类号: TS201.6

文献标志码: A

文章编号: 1002-6630(2013)14-0182-05

doi:10.7506/spkx1002-6630-201314037

盐酸克伦特罗(clenbuterol hydrochloride, CLE)俗称“瘦肉精”,是一种 $\beta$ -肾上腺素受体激动剂,可用于治疗支气管炎、肺气肿等疾病<sup>[1]</sup>。因其可促进动物生长、提高瘦肉率,在畜牧养殖中常被用作饲料添加剂<sup>[2-3]</sup>。但是盐酸克伦特罗在动物体内半衰期长,易造成大量残留,人食用含有盐酸克伦特罗的畜肉和内脏后会出现肌肉震颤、心悸、头疼、恶心、呕吐等中毒症状,严重时可引起死亡<sup>[4-5]</sup>。因此,世界各国均已禁止将盐酸克伦特罗作为饲料添加剂使

用。我国农业部也明确禁止在饲料中添加盐酸克伦特罗,并规定在动物源性食品中不得检出<sup>[6-7]</sup>。

目前精确检测盐酸克伦特罗的国标方法有ELISA法、高效液相色谱法<sup>[8]</sup>、气相色谱串联质谱法<sup>[9]</sup>、液相色谱串联质谱法<sup>[10]</sup>等,这些检测方法准确、灵敏,可用于克伦特罗残留的确证分析。由于食品基质复杂,检测猪肉中CLE的前处理流程一般包括液液萃取及固相萃取柱萃取等步骤,过程复杂、费时、费力,且前处理产

收稿日期: 2012-07-01

基金项目: “十二五”国家科技支撑计划项目(2011BAK10B06; 2011BAK10B04);

江西省科技厅自然科学基金项目(2010GZN0143); 南昌大学分析测试基金项目(2012028)

作者简介: 李超辉(1987—),男,硕士研究生,研究方向为食品安全。E-mail: lichaoahui1987411@126.com

\*通信作者: 郭亮(1974—),男,助理研究员,硕士,研究方向为食品安全。E-mail: bioguo@ncu.edu.cn

物含有与待分析物化学性质相似的杂质,存在一定的基质干扰,因此迫切需要建立一个净化效果好、简单、快速的前处理方法。磁性材料在分析化学中的应用日渐普遍,有效的简化了前处理流程,提高了富集效率,缩短了前处理时间<sup>[11-18]</sup>,免疫磁珠分离技术是以抗体包被的磁珠为载体,利用抗原、抗体的特异性结合形成抗原-抗体-磁珠复合物,该复合物在磁场作用下可定向运动,从而实现抗原的特异性分离<sup>[19]</sup>。该方法结合了分散固相萃取的高效性、免疫亲合作用的特异性及磁回收的简便性,可有效简化前处理流程,缩短前处理时间,提高富集、净化效率<sup>[20-21]</sup>。

本研究以生物素-链霉亲和素系统为介导,将盐酸克伦特罗单克隆抗体偶联至纳米磁珠表面,并以该免疫磁珠为吸附剂建立了猪肉中克伦特罗的免疫富集方法。

## 1 材料与方法

### 1.1 材料、试剂与仪器

猪后腿瘦肉样本购自本地超市(-20℃冷冻保存)。

盐酸克伦特罗、*N*-羟基琥珀酰亚胺(Sulfo-NHS)、1-乙基-(3-二甲氨基丙基)碳酰二亚胺(EDC) 美国Sigma公司; 180nm羧基化磁珠(羧基密度150μmol/g) 上海奥润微纳新材料科技有限公司; 链霉亲和素(streptavidin, SA) 上海华蓝化学科技有限公司; 活泼酯化的长链生物素、BCA蛋白定量试剂盒 美国Pierce公司; 克伦特罗单克隆抗体、克伦特罗ELISA检测试剂盒 无锡中德伯尔生物技术有限公司; 实验中使用的其他分析纯试剂上海国药集团化学试剂有限公司。

DNM-9602酶标仪 北京普朗新技术有限公司; FS-1200超声波处理器 上海生析超声仪器有限公司; 磁架 无锡中德伯尔生物技术有限公司; TGL-16G离心机 上海安亭科学公司; Millipore Simplicity超纯水仪美国Milipore公司。

### 1.2 方法

#### 1.2.1 生物素化标记抗体的制备

称取活泼酯化的长链生物素,加适量PBS(pH7.0)溶液溶解;将长链生物素与抗体按物质的量比3:1比例混合,调整溶液pH值至8.0;室温反应60min后将反应溶液于4℃用PBS缓冲液透析3d除去未反应的生物素。透析产物按体积比1:1加入甘油保存于-20℃备用。

#### 1.2.2 磁珠与链霉亲和素(SA)的偶联

取10mg羧基化磁珠,依次用无水乙醇、1mol/L NaOH、1mol/L HCl及PB(0.02mol/L, pH6.0)溶液洗涤后,用PB重悬磁珠。按磁珠表面羧基与EDC、Sulfo-NHS物质的量比为1:3:3分别加入EDC以及Sulfo-NHS,37℃振荡反应2h活化磁珠表面羧基。磁架回收磁珠, PB洗涤

3次后磁珠重悬于PB中。活化后的磁珠加入含350μg SA的0.01mol/L PB缓冲液(pH8.0)中37℃反应2h,最后反应产物加入乙醇胺室温封闭2h。磁架回收磁珠, PB洗涤3次后重悬于含0.5% BSA、0.05%叠氮钠的0.02mol/L的PB(pH8.0)中,4℃保存备用。

#### 1.2.3 免疫磁珠的合成

取1.0mg链霉亲和素磁珠,加入224μg生物素化抗体37℃振荡孵育20min。磁架回收磁珠,磁珠重悬于含0.5% BSA、0.05%叠氮钠的0.02mol/L的PB(pH8.0)中并于4℃保存备用。链霉亲和素磁珠以及免疫磁珠的偶联率测定流程如下:采用BCA试剂盒测定磁珠偶联反应后的上清液蛋白含量,将上清液中蛋白残留量除以蛋白投入量即为磁珠与蛋白的偶联率。BCA试剂盒操作流程按说明书进行。

#### 1.2.4 样品前处理

准确称取(1.00±0.01)g经匀浆器捣碎的猪肉样品,加入2.5mL 0.15mol/L盐酸后于涡旋振荡器上振荡3min,静置提取15min后16000r/min离心5min,收集上清液。沉淀继续加入1.5mL 0.15mol/L HCl溶液,涡旋振荡3min,静置5min后16000r/min离心5min,合并2次上清液。1mol/L NaOH溶液调节上清液pH值至7.0,16000r/min离心5min,弃沉淀;上清液中加入0.25mg免疫磁珠,超声混匀后置于摇床以转速200r/min、37℃振荡吸附5~10min。磁架回收磁珠,0.5mL PB淋洗磁珠1次,100μL甲醇超声重悬磁珠,静置洗脱5min,洗脱液用PB稀释至1mL后用克伦特罗ELISA检测试剂盒检测。

#### 1.2.5 ELISA方法检测CLE含量

按ELISA检测试剂盒说明书操作。测定洗脱液中CLE含量时,用甲醇-PB(1:9, V/V)混合液配制CLE标准液制备ELISA标准曲线,以消除洗脱液中甲醇对检测的影响。

## 2 结果与分析

### 2.1 免疫磁珠的制备

#### 2.1.1 链霉亲和素磁珠的制备

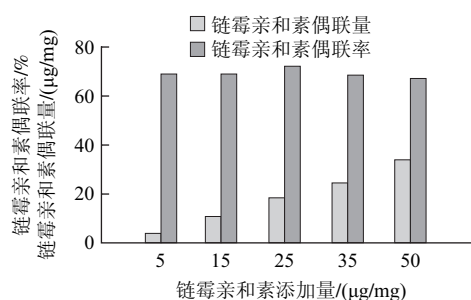


图1 链霉亲和素添加量对磁珠上链霉亲和素偶联量及偶联率的影响  
Fig.1 Effect of streptavidin amount on the coupling content and efficiency of magnetic nanobeads

取5份磁珠(2mg/份)经EDC、Sulfo-NHS活化后,分别加入10、30、50、70、100 $\mu$ g的SA进行偶联反应。经BCA试剂盒测定偶联后上清液中的残留链霉亲和素的浓度,计算磁珠上链霉亲和素的偶联量及偶联效率。结果如图1所示,随反应体系中SA添加量的提高,链霉亲和素的偶联量分别为3.4、10.2、18、23.9、33.5 $\mu$ g/mg磁珠,偶联率为68%~72%,以上结果显示磁珠上SA结合量随SA添加量增大而增加,但偶联效率变化不大。

### 2.1.2 抗体标记磁珠的优化

链霉亲和素与生物素间具有极高的亲和力,亲和常数为 $10^{15}$ L/mol,呈不可逆反应性。每个亲和素分子有4个生物素结合部位,可同时结合多个生物素化的大分子。因此,通过在磁珠上偶联的链霉亲和素可将大量生物素化的抗体牢固地结合在磁珠上。为在磁珠上结合更多的抗体,本研究将SA偶联量较高(18、23.9、33.5 $\mu$ g/mg磁珠)的3组链霉亲和素磁珠各取4份,每份0.2mg,用于与生物素化抗体结合反应的优化。结合反应体系中抗体添加量按与磁珠上链霉亲和素的物质的量比分别为1:1、2:1、3:1、4:1进行。结果如图2所示,当磁珠上SA的量相等时,抗体结合量随抗体添加比例的增加而增加;当抗体添加比例相同时,抗体结合量随磁珠上SA量的增加而增加。其中3种反应体系的抗体结合量较大:SA偶联量为33.5 $\mu$ g/mg的链霉亲和素磁珠,抗体添加物质的量比为3:1、4:1时,抗体结合量分别为75.2、78.9 $\mu$ g/mg磁珠;SA偶联量为23.9 $\mu$ g/mg的链霉亲和素磁珠,抗体添加物质的量比为4:1时,抗体结合量为77.2 $\mu$ g/mg磁珠。上述3种反应体系中抗体用量依次为224、309、220 $\mu$ g/mg磁珠,但所得免疫磁珠上抗体结合量差别却很小。因此,在保证吸附能力的同时,为降低合成成本,免疫磁珠的合成工艺确定为在1mg磁珠与35 $\mu$ g SA的偶联反应产物中添加4倍磁珠上SA摩尔数的生物素化抗体(220 $\mu$ g),即可得到抗体偶联量为77.2 $\mu$ g/mg的免疫磁珠。

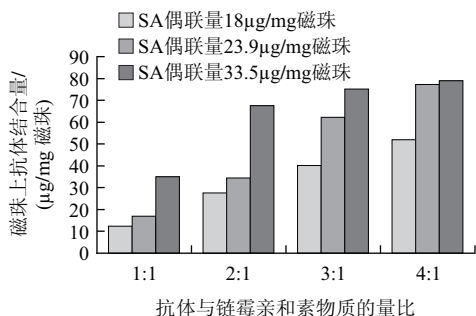


图2 链霉亲和素磁珠偶联生物素标记抗体的条件优化

Fig.2 Optimization of the coupling conditions for biotinylated antibody with streptavidin coated magnetic nanobeads

## 2.2 吸附条件的优化

### 2.2.1 pH值对吸附率的影响

用1mL pH值分别为5.0、6.0、6.5、7.5、8.0、8.5、

9.0、10.0的0.01mol/L PBS缓冲液配制10ng/mL的CLE溶液,各加入0.1mg免疫磁珠,置于摇床以转速200r/min、37℃振荡吸附15min。磁架回收磁珠,用ELISA方法测上清液中CLE残留量,计算不同pH值时的吸附率。结果如图3所示,当溶液pH值为7时吸附效率最高;当pH值大于7时,吸附率随pH值的提高迅速降低。

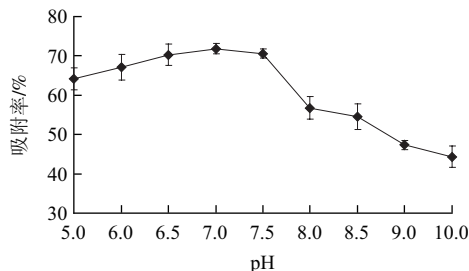


图3 pH值对吸附率的影响

Fig.3 Effect of pH on adsorption efficiency

### 2.2.2 盐离子浓度对吸附率的影响

用1mL NaCl浓度分别为0、0.05、0.1、0.15、0.2、0.5、0.75、1mol/L的超纯水配制10ng/mL的CLE溶液。各加入0.1mg免疫磁珠,置于摇床以转速200r/min、37℃振荡吸附15min。磁架回收磁珠,用ELISA方法测上清液中CLE残留含量,计算不同NaCl浓度时的吸附率。结果如图4所示,当NaCl浓度大于0.15mol/L时吸附效率小于40%,当NaCl浓度低于0.1mol/L时,磁珠对CLE的吸附率维持在70%左右,表明免疫磁珠吸附CLE受盐离子的干扰,但是当盐浓度低于0.1mol/L时对吸附率的影响不大。

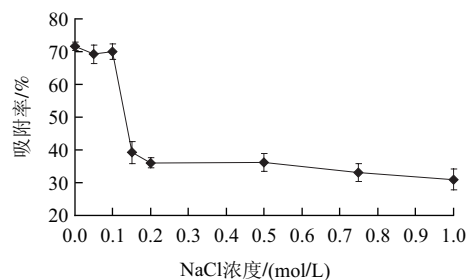


图4 NaCl浓度对吸附率的影响

Fig.4 Effect of salt concentration on adsorption efficiency

### 2.2.3 吸附时间对吸附率的影响

用pH7.0的0.01mol/L PBS配制5份1mL 10ng/mL CLE溶液,各加入0.1mg磁珠,置于摇床以转速200r/min、37℃分别振荡吸附5、10、15、20、25、30min,磁架分离磁珠终止吸附。用ELISA方法测上清液中CLE残留量,计算不同吸附时间的吸附率。结果如图5所示,吸附在5min内即可达到平衡,10min内吸附率比较稳定,但随吸附时间的延长,吸附率略有下降,其原因可能是抗体在37℃条件下会丧失部分活性,因此吸附时间不宜过长。

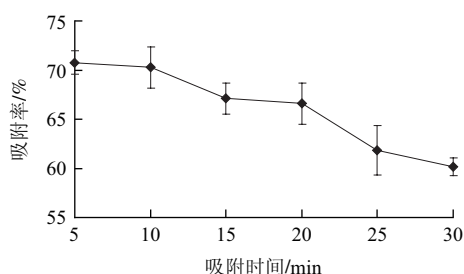


图5 吸附时间对吸附率的影响

Fig.5 Effect of incubation time on adsorption efficiency

### 2.3 免疫磁珠用量对吸附率的影响

在6份1mL含10ng CLE的PBS(0.01mol/L, pH7.0)溶液中添加0.1、0.15、0.2、0.25、0.3、0.4mg磁珠,置于摇床以转速200r/min、37℃振荡吸附10min。磁架分离磁珠,用ELISA方法测上清液中CLE含量,计算不同磁珠用量时CLE的吸附率。结果如图6所示,随磁珠用量的加大,吸附率显著提高;当磁珠用量大于0.25mg时, CLE的吸附率大于90%。

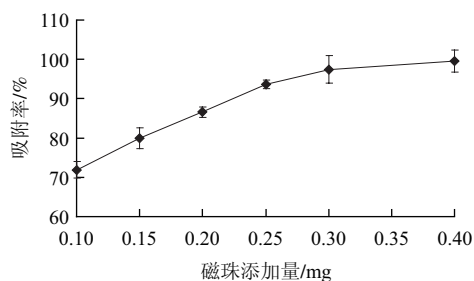


图6 磁珠添加量对吸附率的影响

Fig.6 Effect of immunomagnetic nanobead amount on adsorption efficiency

### 2.4 洗脱条件优化

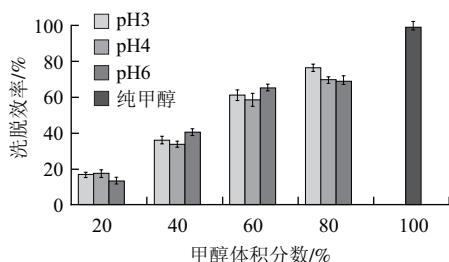


图7 洗脱溶剂对洗脱效率的影响

Fig.7 Effect of elution buffer on desorption efficiency

取13份各0.1mg磁珠分别加入1mL 10ng/mL的克伦特罗PBS(0.01mol/L, pH7.0)溶液中,振荡吸附10min。磁架分离磁珠,用ELISA方法检测上清液中CLE残留量,计算磁珠对CLE的吸附量,磁珠用于考察不同洗脱溶剂的洗脱效率。将pH值为3、4、6的磷酸氢二钠-柠檬酸缓

冲液分别与甲醇按不同体积比混合,得到甲醇体积分数为20%、40%、60%、80%的12种混合液。以100μL上述12种混合液及纯甲醇作为洗脱溶剂洗脱0.1mg磁珠上的CLE,洗脱液经PBS稀释后用ELISA方法检测其中CLE的含量,计算洗脱效率。结果如图7所示,洗脱效率随洗脱溶剂中甲醇含量的提高增至98.9%,洗脱溶剂pH值对洗脱效率影响不大。因此本研究以纯甲醇为洗脱溶剂洗脱免疫磁珠上的CLE。

### 2.5 免疫磁珠重复使用性

磁珠的重复使用性在其实际应用中具有重要意义,本研究考察免疫磁珠重复使用4次的平均回收率。在pH7.0的条件下,用1.25mg磁珠吸附5mL 10ng/mL的CLE溶液中的CLE。使用后的磁珠用PBS淋洗并重复使用3次,分别计算4次CLE的回收率。结果如图8所示,随免疫磁珠使用次数的增加,CLE回收率逐渐降低至23.8%。

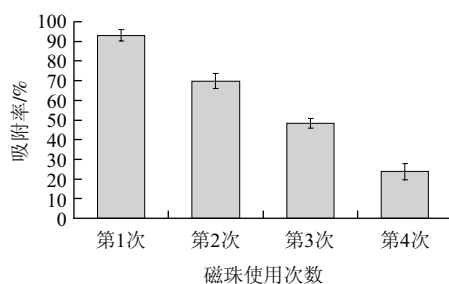


图8 磁珠使用次数对吸附率的影响

Fig.8 Effect of repeated use time on adsorption efficiency

### 2.6 加标回收实验

称取1.0g猪肉样品,均质1min后添加CLE标准溶液使其终添加量为0.25、0.5、1、2、5ng/g猪肉,静置15min使CLE被猪肉充分吸收。按方法1.2.2节进行猪肉样品前处理,洗脱液稀释10倍后用ELISA方法检测洗脱液中CLE含量,计算回收率。结果如图9所示,加标量为0.25~2ng/g时回收率大于80%,相对标准偏差为11.9%~15.7%;加标量为5ng/g时回收率降至61.2%,相对标准偏差为7.8%,表明猪肉提取物中的基质对免疫磁珠吸附CLE容量有较大影响。

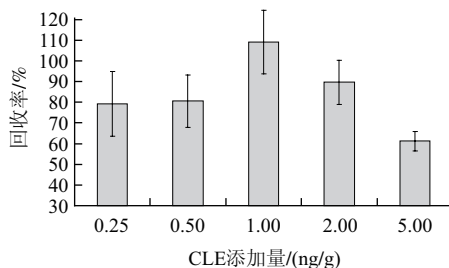


图9 不同克伦特罗加标量时的回收率

Fig.9 Recovery rates of spiked samples with different CLE concentrations



### 3 结 论

本研究以生物素-链霉亲和素系统为介导,将CLE单克隆抗体偶联至纳米磁珠上合成免疫磁珠。免疫磁珠的合成工艺为在1mg磁珠与35 $\mu$ g SA的偶联产物中添加220 $\mu$ g生物素化抗体共孵育5min,即可得到抗体偶联量为77.2 $\mu$ g/mg的免疫磁珠。该免疫磁珠吸附CLE的最佳pH7;盐离子可干扰吸附,但当盐浓度低于0.1mol/L时对吸附率影响不大;甲醇可高效洗脱磁珠吸附的CLE。用0.25mg磁珠富集1.0g CLE加标猪肉,加标量为0.25~2ng/g时,回收率大于80%。

### 参考文献:

- [1] BAZYLA G, NAGELS L J. Simultaneous high-throughput determination of clenbuterol, ambroxol and bromhexine in pharmaceutical formulations by HPLC with potentiometric detection[J]. Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis, 2003, 32(4/5): 887-903.
- [2] WILLIAMS A P E V, PAGLIANI A L, INNESA I G M, et al. Effects of a  $\beta$ -agonist (clenbuterol) on growth, carcass composition, protein and energy metabolism of veal calves[J]. British Journal of Nutrition, 1987, 57(3): 417-428.
- [3] RICK C A, BAKER P K, DALRYMPLE R H. Use of repartitioning agents to improve performance and body composition of meat animals[J]. Recipr Meat Conf Proc, 1984, 37: 5-11.
- [4] ZHANG G P, WANG X N, YANG J F, et al. Development of an immunochromatographic lateral flow test strip for detection of  $\beta$ -adrenergic agonist clenbuterol residues[J]. Journal of Immunological Methods, 2006, 312(1/2): 27-33.
- [5] MALTIN C A, DELDAY M I, WATSON J S, et al. Clenbuterol, a  $\beta$ -adrenoceptor agonist, increases relative muscle strength in orthopaedic patients[J]. Clinical Science, 1993, 84(6): 651-654.
- [6] LAI Weihua, FUNG D Y C, XU Y, et al. Screening procedures for clenbuterol residue determination in raw swine livers using lateral-flow assay and enzyme-linked immunosorbent assay[J]. Journal of Food Protection, 2008, 71(4): 865-869.
- [7] 樊晓博, 杨金易, 高秀杰, 等.  $\text{Eu}^{3+}$  标记抗原盐酸克伦特罗的时间分辨荧光免疫检测[J]. 食品科学, 2010, 31(20): 307-310.
- [8] 中华人民共和国卫生部, 中国国家标准委员会. GB/T 5009.192—2003 动物性食品中克伦特罗残留量的测定[S].
- [9] 中华人民共和国农业部. 农业部1031号公告-3-2008 猪肝和猪尿中 $\beta$ -受体激动剂残留检测: 气相色谱-质谱法[S].
- [10] 中华人民共和国农业部. 农业部1025号公告-18-2008 动物源性食品中 $\beta$ -受体激动剂残留检测: 液相色谱-串联质谱法[S].
- [11] AGUILAR-ARTEAGA K, RODRIGUEZA J A, BARRADO E. Magnetic solids in analytical chemistry: a review[J]. Analytica Chimica Acta, 2010, 67(2): 157-165.
- [12] WU Wei, HE Quanguo, JIANG Changzhong. Magnetic iron oxide nanoparticles: synthesis and surface functionalization strategies[J]. Nanoscale Res Lett, 2008, 3(11): 397-415.
- [13] FERNÁNDEZ-BALDO M A, BERTOLINO F A, MESSINA G A, et al. Modified magnetic nanoparticles in an electrochemical method for the ochratoxin A determination in *Vitis vinifera* red grapes tissues[J]. Talanta, 2010, 52(2): 651-657.
- [14] 张健文, 熊勇华, 陈雪岚, 等. 磺酸化磁珠富集鱼塘水中的孔雀石绿[J]. 分析化学, 2011, 39(5): 753-756.
- [15] GUO Liang, ZHANG Jianwen, WEI Hua, et al. Nanobeads-based rapid magnetic solid phase extraction of trace amounts of leucomalachite green in Chinese major carps[J]. Talanta, 2012, 97: 336-342.
- [16] WU L Y, LIU T C, HOPKINS M R, et al. Chemoaffinity capture of pre-targeted prostate cancer cells with magnetic beads[J]. Prostate, 2012, 72(14): 1532-1541.
- [17] 吴科盛, 许恒毅, 郭亮, 等. 磁性固相萃取在检测分析中的应用研究进展[J]. 食品科学, 2011, 32(23): 317-320.
- [18] 熊齐荣, 牛瑞江, 解泉源, 等. 磁珠离子交换吸附法纯化兔血清中多克隆抗体的研究[J]. 食品科学, 2011, 32(13): 259-263.
- [19] 喻伟. 免疫磁珠的制备及其初步应用[D]. 武汉: 华中农业大学, 2010.
- [20] QIU Shuang, XU Li, CUI Yiran, et al. Pseudo-homogeneous immunoextraction of epitestosterone from human urine samples based on gold-coated magnetic nanoparticles[J]. Talanta, 2010, 51(3): 819-823.
- [21] DEVLIN R, CAMPBELL K, KAWATSU K, et al. Studies in the use of magnetic microspheres for immunoaffinity extraction of paralytic shellfish poisoning toxins from shellfish[J]. Toxins, 2011, 3(1): 1-16.