

### 新型 $\beta$ -兴奋剂多合一 ELISA 检测试剂盒

#### 简介

克伦特罗 (Clenbuterol)、沙丁胺醇 (Salbutamol) 与莱克多巴胺 (Ractopamine) 分别属于众多哮喘药 [ $\beta$ -兴奋剂] ( $\beta$ -Agonist) 中的最重要的几种, 猪农使用这类化学物可增加猪只的瘦肉比例, 以提高售价, 但这类药物有许多副作用, 轻则引起心慌、肌肉震颤、头痛、恶心、呕吐以及脸部潮红等不良反应。尤其对心率失常、高血压、青光眼、糖尿病、甲状腺机能亢进等疾病的患者, 其危险性更为严重。若长期食用, 甚至有可能引发心脏病或诱发恶性肿瘤。

近年来, 起因于  $\beta$ -兴奋剂残留过量导致中毒的案例层出不穷, 因此, 此类药物残留的检测已是猪肉普遍流通的区域必须面对的重要课题。

传统上, 药物残留的检测普遍利用 HPLC 与 TLC 来进行, 然而, 根据过去经验, 克伦特罗 / 沙丁胺醇 / 莱克多巴胺样品处理方式既费时又费成本; 因此, 必须简化样品处理方式, 并利用敏感度较高的酶联免疫检验法来检测, 方可去除以上种种缺点。

本公司新研发的新型  $\beta$ -兴奋剂多合一 (New  $\beta$ -Agonist combo) 免疫微量检测试剂可针对目前市面上普遍受重视的三种瘦肉精 (包括: 克伦特罗、沙丁胺醇、莱克多巴胺) 作一次性的筛检, 使用既简便、费时又短, 整个操作过程不到 60 分钟即可完成, 因此已成为广泛用来检测  $\beta$ -兴奋剂残留的检验试剂套组。

#### 反应原理

本公司所研发的新型  $\beta$ -兴奋剂多合一 (New  $\beta$ -Agonist combo) 免疫微量检验试剂, 主要是利用抗原与抗体的特异性免疫化学反应的基本原理来进行的, 换句话说, 就是利用酶标记物与样品中的克伦特罗、沙丁胺醇或莱克多巴胺对微孔中的抗体来进行竞争反应。

在整个反应当中, 如果检品中的克伦特罗或沙丁胺醇或莱克多巴胺残留的越多, 相对地就会竞争掉越多的酶标记物, 使得能结合上抗体的酶标记物相对地就会很少, 因此, 反应中的酶标记物-底物的呈色就会很淡, 甚至几乎没有颜色, 此即为阳性反应; 反之, 若样品中没有含克伦特罗或沙丁胺醇或莱克多巴胺等瘦肉精, 则呈色会较深, 与阴性标准品呈色几乎是一样的, 此即为阴性反应。

#### 试剂盒组成

- 1、微量测试孔板 (Microtiter well plate): 每条 8 孔, 一板 12 条。
- 2、克伦特罗标准品溶液 (Clenbuterol standard):  
0 ppb、0.1 ppb、0.25 ppb、0.5 ppb、1ppb、2 ppb 各一瓶, 1mL /瓶。
- 3、10 倍浓缩清洗液 (10X Concentrate Washing Solution): 一瓶, 50 mL /瓶。
- 4、150 倍浓缩酶标记物 (150X Concentrate Enzyme Conjugate): 一瓶, 0.15 mL /瓶。
- 5、样品稀释液 (Sample Dilution Solution): 一瓶, 30 mL /瓶。
- 6、10 倍浓缩酶标记物稀释液 (10X Conc. Enzyme Conjugate Dilution Solution): 一瓶, 18mL/瓶。
- 7、底物 (Substrate Solution, TMB): 一瓶, 12 mL /瓶。
- 8、反应终止液 (Stop Solution): 一瓶, 13 mL /瓶。

#### 试剂盒使用说明

##### A、注意事项

1、将待测样品、微量测试孔板、标准品溶液 6 瓶、10 倍浓缩清洗液、150 倍浓缩酶标记物、酶标记物稀释液、底物、反应终止液, 于室温环境下, 至少回温 40 分钟。

2、1 倍清洗液配制。

利用蒸馏水将 10 倍浓缩清洗液以 1:9 之比例稀释 (即 1 mL 10 倍浓缩清洗液 + 9 mL 蒸馏水), 即可作为

清洗微孔使用的 1 倍清洗液。(10 倍浓缩清洗液请回温后使用, 并请检查溶液底部的结晶是否完全溶解。)

### 3、1 倍酶标记物稀释液配制。

用蒸馏水将 10 倍浓缩酶标记物稀释液以 1:9 的比例稀释(即 1 mL 10 倍浓缩酶标记物稀释液+9 mL 蒸馏水), 即可作为稀释 150 倍浓缩酶标记物的稀释液。

### 4、1 倍酶标记物配制

使用 1 倍酶标记物稀释液将 150 倍浓缩酶标记物以 1:149 的比例稀释(即 0.1 mL 100 倍浓缩酶标记物+14.9 mL 酶标记物稀释液), 即完成 1 倍酶标记物配制。**稀释后的酶标记物请尽快使用, 若保存于-20 °C, 保存期可达一星期。**

### 5、组织萃取液配制

把 10 mL 蒸馏水和 200  $\mu$  L 12N 盐酸加入 90mL 甲醇中即为组织萃取液。

### 6、3% Trichloroacetic acid, TCA(三氯醋酸)配制

称取 3g TCA, 以 100mL 蒸馏水稀释, 即为 3% TCA。

### 7、用剩余的测试条孔则放回铝箔袋中, 储存于 2~8 °C 冰箱。

## B、本试剂盒未提供的试剂

氢氧化钠溶液 (NaOH Solution)

三氯醋酸溶液 (Trichloroacetic acid, TCA)

甲醇 (Methanol)

二氯甲烷 (Dichloromethane)

正己烷 (n-Hexane)

盐酸 (Hydrochloric acid, HCl)

## C、样品制备

本试剂可检测尿液、血清、组织、饲料中残留的  $\beta$ -兴奋剂:

### 1、待测物为尿液, 请依以下方法进行。

将尿液装入离心管中, 以离心机离心(1700g, 10 分钟), 取上清液至少 50  $\mu$  l 进行测试。

**样品敏感度: 0.1ppb**

**稀释倍数: 1**

### 2、待测物为血清, 请依以下方法进行。

取 0.25 mL 血清, 加入 0.5 mL 1 倍酶标记物稀释液以 1:2 (3 倍) 稀释。

震荡混合均匀, 取 50  $\mu$  L 加入到微量测试孔内进行测试分析。

计算结果时务必将稀释倍数 (3 $\times$ ) 换算回去。

**样品敏感度: 0.3ppb**

**稀释倍数: 3**

### 3、待测物为组织, 请依以下方法进行

#### 稀释法

取 1g 已均质组织样品放入 15mL 离心管中, 加入 3mL 3% TCA。

上下震荡混合约 10 分钟后, 以离心机离心(1700g, 10 分钟)。

离心后取上层中段清澈液 0.5 mL 到 15 mL 离心管后再分别加入 0.25 mL 0.5 N 氢氧化钠溶液及 0.25 mL 样品稀释液。

离心机离心(1700g, 10 分钟)。

取上清液 50  $\mu$  L 进行测试。

计算结果时务必将稀释倍数 (8 $\times$ ) 换算回去。

**样品敏感度: 0.8ppb**

**稀释倍数: 8**

### 萃取法

取 1g 已均质组织样品放入 15mL 离心管中, 加入 2mL 组织萃取液。

上下震荡混合约 10 分钟后, 以离心机离心(1700g, 10 分钟)。

离心后取上层中段清澈液 1 mL 到玻璃管后, 于 50 $^{\circ}$ C 利用氮气吹干。

加入 1 mL 1 倍酶标记物稀释液, 回溶之后加入 0.5 mL 二氯甲烷。

震荡混合均匀, 以离心机离心(1700g, 10 分钟)。

取上层清澈液 0.5 mL 至另一离心管, 再加入 0.25 mL 正己烷。

震荡混合均匀, 以离心机离心(1700g, 10 分钟)。

取下层清澈液 50  $\mu$  L 进行测试。

**样品敏感度: 0.2ppb**

**稀释倍数: 2**

4、待测物为饲料, 请依下列方法进行:

取 1g 已磨碎的待测饲料, 加入 1 mL 1N 盐酸以及 9 mL 蒸馏水, 以试管振荡器 (Mixer) 震荡混合约 0.5 分钟后再使用混和器 (Roller) 混和 15 分钟。

以离心机离心 15 分钟 (3000 rpm), 倒出所有上清液到新试管内, 再加入 0.5 mL 1N 氢氧化钠溶液于这支具有上清液的新试管。

以试管振荡器震荡混合约 0.5 分钟, 再以离心机离心 15 分钟 (3000 rpm)

取上清液 0.5 mL 与 1 倍清洗液 3.5 mL 以 1:7 (8 倍) 稀释。

取 50  $\mu$  L 直接进行分析。

**样品敏感度: 8 ppb**

**稀释倍数: 80**

## D、操作步骤

- 1、于适当测试孔分别加入 50  $\mu$  L 标准溶液 (0, 0.1, 0.25, 0.5, 1 与 2ppb)。
- 2、在另外的测试孔加入 50  $\mu$  L 已完成前处理的检品。
- 3、再于每一测试孔另再加入 100  $\mu$  L 已稀释的酶标记物。
- 4、轻敲微孔板四周, 使其充分混合后于室温下避光静置 30 分钟。
- 5、将测试孔中的反应液甩掉, 再将洗液加满每一测试孔后甩掉, 重复洗 3 次。
- 6、最后一次甩掉后, 在吸水纸上拍干。
- 7、于每一测试孔加入底物 100  $\mu$  L 后, 轻敲微孔板四周, 使其充分混合。
- 8、于室温下避光静置 20 分钟。
- 9、加入反应终止液, 每一测试孔加入 100  $\mu$  L。
- 10、酶标仪以单波长 450 nm 或双波长 450 nm / 630nm (或 650 nm) 判读。

## E、判定

利用Excel将标准品浓度取Ln, 与相对应吸光值的B/B0 (相对于0值标准品吸光值的百分比) 做线性回归分析 (semi-log), 再将待测样品的B/B0值代入, 则可推算出待测样品浓度 (如图1所示)。

$$\frac{\text{Absorbance standard (or sample)}}{\text{Absorbance (0 ppb standard)}} \times 100 = \frac{B}{B0} \%$$

Example: 若标准曲线为图 1.

待测物吸光值除以标准品 0 ppb 值的吸光值 = X %

则待测物浓度 =  $e^{[(35.272-X)/17.458]}$  ppb

### F、检测下限(Detection limit)

本试剂盒的克伦特罗 (Clenbuterol) 标准品最低检测下限皆为 0.1 ppb, 此浓度的吸光值与阴性标准溶液 (0 ppb) 的吸光值有明显的差异。最高检测上限为 2 ppb, 超出此浓度的样品需经适量稀释后再进行检测。

### G、标准曲线(Standard curve)

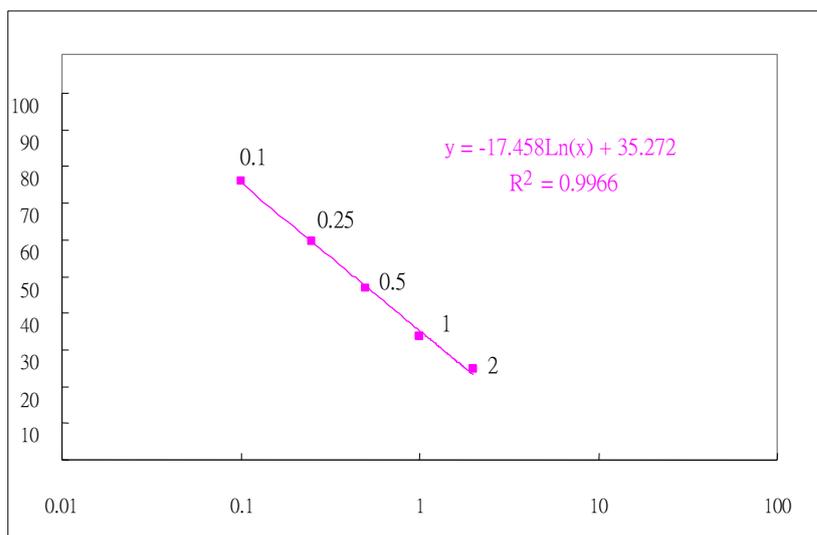


Fig. 1: Calibration Curve for New  $\beta$ -Agonist combo Kits

### H、再现性(Reproducibility)

针对新型  $\beta$ -兴奋剂多合一检验试剂的精密度测试, 在取样数=6 之下, 所得不同浓度标准溶液的吸光值变异系数 (CV%) 如下图所示, 显示新型  $\beta$ -兴奋剂多合一检验试剂盒有很高的再现性:

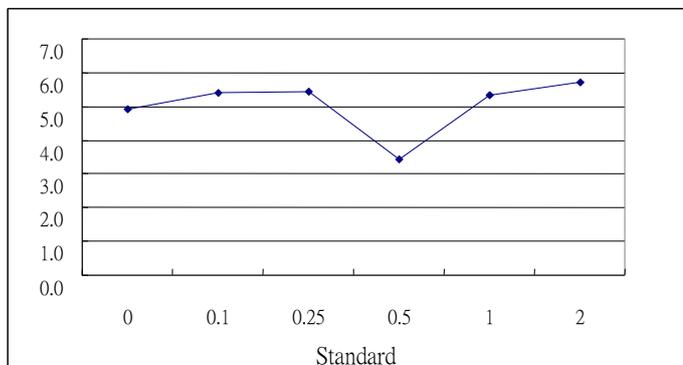


Fig. 2: Interassay Precision Profile for New  $\beta$ -Agonist combo Kits

### I、交叉反应率(Cross-reactivity)

针对以下 $\beta$ -兴奋剂进行特异性交叉反应测试，结果如下：

Compound	Cross-Reactivity (%)
Clenbuterol (克伦特罗)	100
Salbutamol (沙丁胺醇)	80
Ractopamine (莱克多巴胺)	80
Bromobuterol (溴布特罗)	95
Mabuterol (马布特罗)	45
Cimaterol (塞曼特罗)	95

经由上述表格换算，1.00 ppb Clenbuterol 相当于 1.25 ppb Salbutamol，1.25 ppb Ractopamine，1.05 ppb Bromobuterol，2.22 ppb Mabuterol，1.05 ppb Cimaterol，5.00 ppb Zilpaterol，2.00 ppb Tulobuterol。

### J、样品敏感度(Sensitivity)

样品	敏感度 (ppb)
尿液	0.1
血清	0.3
组织(稀释法)	0.8
组织(萃取法)	0.2
饲料	8

### K、回收率(Recovery rate)

样品 (外加 CB 浓度)	回收率 (%)
尿液	60 ~ 140
血清	60 ~ 140
组织	60 ~ 140
饲料	60 ~ 140

注：若检体为尿液，推算后的浓度需扣除背景值再计算回收率。

### L、Q & A

1、加入反应终止液后，没有吸光值或吸光值偏低。

i. 未加入酶标记物。

Ans: 请确实按照操作步骤进行。

ii. 试剂盒内容物未能充分回温。

Ans: 确定试剂盒内容物回温后再进行操作。

iii. 室温太低。

Ans: 若室温太低(<19℃)，请于操作步骤 4，适度延长孵育时间(>40 分钟)。

iv. 未使用试剂盒的清洗液清洗。

Ans: 请用试剂盒内所提供的清洗液清洗。

v. 试剂盒已过有效期限。

Ans: 请更换仍在有效期限内的试剂盒。

vi. 终止实验后太久未判读。

Ans: 请于加入反应终止液后 10 分钟内判读。

2. 标准曲线线性不佳, 或是平行性不佳。

i. 孵育位置避光不确实或受到气流干扰。

Ans: 请确认孵育位置既不透光也不透风 (如抽屉内)。

ii. 操作时间拖太久。

Ans: 请在方法熟练后再进行操作。

iii. 微孔间相互污染。

Ans: 加样品时, 请小心勿溅出微孔外, 造成其它微孔的污染。

iv. 标准品或酶标记物所加入的量不一致。

Ans: 请使用已校正过的移液器, 并确保其与吸头之间有高度密合性。

v. 添加样品或试剂的操作方法不正确。

Ans: 加样品或试剂时, 吸头请勿接触微孔。

vi. 洗板过程发生问题 (如管路堵塞、洗完板后未立刻进行下一步骤)。

Ans: 请随时监控洗板机洗板过程, 洗完后立即进行下一步骤。

3. 吸光值均偏高 (或线性不够陡)

i. 室温太高 (>25℃)。

Ans: 若无法降低室内温度, 请适度缩短步骤 4 的反应时间 (<30 分钟)。

ii. 底物溶液 (TMB) 受到污染。

Ans: 若发现底物溶液已呈现淡蓝色, 请勿再使用。

iii. 反应时间超过太久。

Ans: 请控制反应时间。

iv. 酶标记物污染了盒内其它试剂。

Ans: 使用过的吸头应立即丢弃, 可避免试剂间相互污染, 凡是试剂 (特别是酶标记物与底物溶液) 接触过的容器应立即清洗干净 (先以漂白水浸泡, 再以清水冲洗干净, 可确保无残留)。

4. 阴性标准品的吸光值低于阳性标准品的吸光值

i. 微孔中的试剂未能充分混合。

Ans: 试剂加完后, 记得需轻敲板四周使其充分混合均匀。

ii. 洗板过程发生问题 (同 2-vi)。

Ans: 请参考 2-vi。

iii. 添加样品或酶标记物的量不一致。

Ans: 请参考 2-iv。