

盐酸克伦特罗抗体纯化及直接竞争ELISA方法研究

袁利鹏¹, 卢倚群², 孙远明², 徐振林², 雷红涛²

(1. 广东农工商职业技术学院热作系, 广东 广州 510640;

2. 广东省食品质量安全重点实验室, 农业部农产品贮藏质量安全风险评价重点实验室, 广东 广州 510642)

摘要: 对比饱和硫酸铵法、辛酸法、辛酸-硫酸铵法和硫酸铵-DEAE-纤维素法4种纯化方法对盐酸克伦特罗抗体的纯化效果, 研究简易过碘酸钠法与3种改良过碘酸钠法对抗体-辣根过氧化物酶标记率的影响, 基于酶标记抗体建立快速检测盐酸克伦特罗的直接竞争酶联免疫分析(ELISA)方法。结果表明: 辛酸法纯化抗体得率最高, 但纯度最差; 辛酸-硫酸铵和硫酸铵-DEAE-纤维素法纯化抗体得率较低, 但纯度最好。简易过碘酸钠法所获得的抗体-酶标记得率最高, 但抗体效价偏低, 改良过碘酸钠法获得的抗体效价明显升高。直接竞争ELISA方法检测盐酸克伦特罗的最低检测限为2.7 ng/mL, 尿样加标回收率94.2%, 批内变异系数为9.1%, 批间变异系数为13.8%, 与其他结构类似物无明显交叉反应。该方法具有操作简便、步骤少、灵敏度高、特异性更好等特点, 可进一步在克伦特罗的监测中发挥重要作用。

关键词: 克伦特罗; 纯化; 酶标记; ELISA

Purification of Anti-Clenbuterol Antibody and Development of Direct Competitive ELISA

YUAN Li-peng¹, LU Qi-qun², SUN Yuan-ming², XU Zhen-lin², LEI Hong-tao²

(1. Department of Tropical Crops, Guangdong AIB Polytechnic College, Guangzhou 510640, China;

2. Key Risk Assessment Laboratory of Agricultural Product Preservation, Ministry of Agriculture, Guangdong Provincial Key Laboratory of Food Quality and Safety, Guangzhou 510642, China)

Abstract: Four methods, including saturated ammonium sulfate (SAS), caprylic acid (CA), caprylic acid-ammonium sulfate (CA-AS) and ammonium sulfate-DEAE-cellulose (SAS-DEAE) were compared for their effectiveness in the purification of anti-clenbuterol antibodies. Meanwhile, the effect of simple NaIO₄ method and its three different modified versions on antibody labeling with horseradish peroxidase (HRP) was examined. The labeled antibodies were applied to develop a direct competitive ELISA assay for rapid detection of clenbuterol. Our results indicated that the highest yield of anti-clenbuterol antibodies was obtained using the CA method, which, however, provided the lowest purity. The SAS-DEAE method gave rise to the highest purity despite providing a relatively lower yield. The simple NaIO₄ method was most effective in labeling anti-clenbuterol antibodies but resulted in a lower antibody titer. By contrast, the modified NaIO₄ methods provided significantly increased antibody titer. The limit of detection of the ELISA method was 2.7 ng/mL. The recovery of clenbuterol from spiked urine samples was 94.2%, and the inter-assay and intra-assay coefficient of variation (CV) were 13.8% and 9.1%, respectively. Moreover, no cross-reactivity with clenbuterol analogues was observed. This ELISA method can provide a simple, sensitive and specific approach to detecting clenbuterol in animal-derived food products.

Key words: clenbuterol; purification; enzyme-labeled antibody; enzyme-linked immunosorbent assay (ELISA)

中图分类号: TS207.3

文献标志码: A

文章编号: 1002-6630(2013)14-0227-05

doi:10.7506/spkx1002-6630-201314046

盐酸克伦特罗(clenbuterol, CL)是人工合成的肾上腺素 β 受体选择性激动剂, 用于治疗动物和人的阻塞性支气管炎哮喘^[1]。20世纪70年代, 美国将其引入畜禽生产,

可以促进肌肉生长、减少胴体脂肪、提高瘦肉率^[2]。但是, CL能在动物内脏和组织中形成蓄积性残留, 严重影响动物性食品安全^[3]。许多国家已明令禁止在动物性

收稿日期: 2013-04-15

基金项目: 农业部公益性行业(农业)科研专项(201003008-08); 国家自然科学基金面上项目(21105030);

广州市科技计划项目(12C12101663)

作者简介: 袁利鹏(1979—), 男, 讲师, 硕士研究生, 研究方向为食品加工与检测。E-mail: lipengywillboy@126.com

产品生产过程中使用CL, 并相继建立饲料和家畜尿、血、肝、眼中CL的测定方法。目前主要分析方法主要包括高效液相色谱法(high-performance liquid chromatography, HPLC)^[4]、液相色谱-质谱联用(liquid chromatography mass spectrometry, LC-MS/MS)^[5-6]、气相色谱-质谱联用法(gas chromatography mass spectrometry, GC-MS)^[7-8]和免疫化学法如酶联免疫分析法(enzyme-linked immuno sorbent assay, ELISA)^[9-11]、化学发光酶联免疫分析方法^[12-14]、胶体金免疫检测试纸条^[15-17]、生物传感器法^[18]等。目前常用的CL监测方法通常以免疫分析法作为在现场抽样快速筛选检验方法, HPLC或GC-MS作为确定性的定量检验方法。在免疫分析法中, ELISA是一种将抗体、抗原的特异反应与酶底物的高效催化作用相结合起来的高敏感性分析方法, 具有特异性强、便于大规模检查及适合现场或基层使用等特点。目前我国进出口检验检疫、兽医卫生部门及屠宰场使用的ELISA试剂盒主要依赖德国R-Biopharm、英国Randox等公司进口, 价格昂贵, 在一定程度上限制了其使用范围。虽然目前国内检测CL的ELISA试剂盒也已面世, 但与国外的相比, 普遍存在不稳定等诸多问题。进一步研究更准确, 更快捷的CL检测方法就非常重要。抗体一般都需要经过纯化以去除杂蛋白更好地应用于免疫学分析^[19]。本实验利用兔抗CL血清, 经纯化后进行辣根过氧化物酶(horseradish peroxidase, HRP)酶标记, 进一步用所得抗体的酶标抗体建立直接竞争ELISA方法, 以期开发ELISA试剂盒提供依据。

1 材料与方法

1.1 材料与试剂

抗CL兔血清、包被原OVA-CL由实验室自制。

羊抗兔IgG-辣根过氧化物酶生化试剂 武汉博士德生物工程有限公司; 肾上腺素、重酒石酸去甲肾上腺素 华南农业大学校医院; 双氯灭痛、盐酸溴己新、硫氰酸红霉素、甲砒霉素、莱克多巴胺、氟苯化考、北里霉素、乙氧酰胺苯甲酯 华南农业大学动物科学系; 高碘酸钠(分析纯) 天津市福晨化学试剂厂; 辣根过氧化物酶(HRP) 上海伯奥生物技术有限公司。

1.2 仪器与设备

DG3022A型酶联免疫检测仪 南京华东电子集团医疗装备有限责任公司; DYY-III-8B稳压稳流电泳仪、DYY-III型电泳槽 北京六一仪器厂; 752紫外光栅分光光计 上海光学仪器厂。

1.3 方法

1.3.1 抗体的纯化

1.3.1.1 饱和硫酸铵(SAS)法

取兔抗血清1mL加等量0.01mol/L pH7.4 PBS, 于搅

拌时逐滴加入与血清等量的饱和硫酸铵。4℃条件下静置3h以上, 离心(3000r/min)20min, 弃上清液, 以PBS溶解沉淀至2mL, 再逐滴加硫酸铵至饱和, 4℃条件下静置3h以上, 重复上述第2步2次, 将末次离心后所得沉淀物以0.01mol/L pH7.4 PBS溶解至2mL, 装入透析袋对PBS充分透析, 中间换液3次, 将透析袋内样品取少许作适当倍数稀释后, 以752紫外光栅分光光计测蛋白含量, 计算IgG蛋白得率, 并进行电泳测定其纯度。

1.3.1.2 辛酸法

向1mL兔血清加入2mL 0.06mol/L, pH5.0乙酸缓冲液, 用0.1mol/L HCl溶液调至pH5.0, 室温搅拌同时逐滴加入75μL辛酸, 继续搅拌30min, 然后10000r/min离心30min, 保留上清液, 滤纸过滤除去残留的沉淀, 用1mol/L的NaOH溶液调至pH7.4, 过Sephadex G-25柱。收集滤液测定蛋白量与纯度。

1.3.1.3 辛酸-硫酸铵法

参考文献[20]方法进行, 有改动。重复以上辛酸法至过滤除去残留沉淀, 用1mol/L的NaOH溶液调至pH7.4, 边搅拌边逐滴加入等体积的饱和硫酸铵。4℃条件下静置3h以上, 4000r/min离心20min, 弃上清液, 沉淀用1mL 0.01mol/L pH7.4 PBS溶解, 再加入0.5mL SAS。4℃, 静置3h以上, 4000r/min离心20min, 弃上清液, 最后沉淀溶于1mL 0.01mol/L pH7.4 PBS; 重复SAS方法最后透析及测定2步。

1.3.1.4 DEAE-纤维素离子交换柱层析法

参考文献[2]方法进行。

1.3.2 蛋白含量计算

蛋白质含量按式(1)^[21]计算:

$$\text{蛋白含量}/(\text{mg/mL}) = (1.45 \times \text{OD}_{280\text{nm}} - 0.74 \times \text{OD}_{260\text{nm}}) \times \text{稀释度} \quad (1)$$

1.3.3 抗体纯度鉴定

采用聚丙烯酰胺凝胶电泳(sodium dodecyl sulfate polyacryl amide gel electrophoresis, SDS-PAGE)法进行蛋白纯度鉴定, 参考文献[22]方法。

1.3.4 辣根过氧化物酶(HRP)标记抗体

1.3.4.1 简易过碘酸钠(NaIO_4)法

称取5mg HRP溶于1mL蒸馏水中, 加入0.2mL新配的0.1mol/L NaIO_4 溶液, 室温条件下避光搅拌10min, 将上述溶液装入透析袋中, 对1mmol/L pH4.4的醋酸钠缓冲液透析。4℃过夜, 加20μL 0.2mol/L pH9.5碳酸盐缓冲液, 使以上醛化HRP的pH值升高到9.0~9.5, 立即加入1mL约含IgG抗体的PBS缓冲液在1mL 0.1mol/L pH9.5碳酸盐缓冲液中, 室温避光搅拌2h, 加0.1mL新配的4mg/mL NaBH_4 液, 混匀再置4℃、2h, 取出后在搅拌时逐滴加入等体积饱和硫酸铵置4℃条件下1h, 3000r/min离心30min, 弃上清液, 沉淀物用半饱和硫酸

铵洗2次,最后沉淀物溶于少量0.01mol/L pH7.4的PBS中,并装入透析袋中,对0.01mol/L pH7.4的PB缓冲盐水透析,10000r/min离心30min去除沉淀,上清液即为酶标记物。测其280、403nm波长处的OD值,进行结果鉴定,补加BSA使最终蛋白质量浓度为10mg/mL,并加入1/2体积甘油,分装后-20℃冰冻保存。酶标记抗体质量指标按式(2)~(5)计算。

$$\text{IgG含量}/(\text{mg/mL})=(\text{OD}_{280\text{nm}}-\text{OD}_{403\text{nm}}\times 0.34)\times 0.62 \quad (2)$$

$$\text{HRP}/\text{IgG}(\text{物质的量比})=\text{HRP}/(\text{mg/mL})/\text{IgG}/(\text{mg/mL})\times 4 \quad (3)$$

$$\text{结合物中酶量}/(\text{mg/mL})=\text{酶量}/\text{mg}\times \text{结合物溶液量}/\text{mL} \quad (4)$$

$$\text{酶结合率}/\%=\text{结合物中酶量}/\text{标记时加入酶量}\times 100 \quad (5)$$

1.3.4.2 改良NaIO₄法1

称取5mg HRP溶于0.5mL蒸馏水中,加入-20℃保存的0.05mol/L NaIO₄水溶液,混匀,置4℃条件下30min,取出后加入0.16mol/L乙二醇水溶液0.5mL,室温放置30min,将上述溶液装入透析袋中,对0.05mol/L pH 9.9碳酸盐缓冲液4℃透析过夜,中间换液3次,然后立即加入已纯化约含5mg IgG抗体的0.01mol/L pH7.4 PBS缓冲液,对0.05mol/L pH9.5碳酸盐缓冲液4℃透析过夜,吸出后加0.2mL 5mg/mL NaBH₄液,混匀至测定280nm和403nm波长处吸光度各步骤用超滤管将其浓缩至最终蛋白含量达10mg/mL,加入1/2体积甘油,分装后,-20℃冰冻保存。

1.3.4.3 改良NaIO₄法2

称取4mg HRP溶于1mL无离子水中,加入-20℃保存的0.1mol/L NaIO₄水溶液室温搅拌20min,醛化HRP溶液先加入12μL 0.2mol/L pH4.4乙酸盐缓冲液,将上述溶液装入透析袋中,对1mmol/L该乙酸盐缓冲液4℃透析过夜,立即加入约含5mg IgG抗体的0.01mol/L pH7.4 PBS缓冲液,对0.05mol/L pH9.5碳酸盐缓冲液透析过夜,吸出后加入0.2mL 5mg/mL NaBH₄液,混匀至测定280nm和403nm波长处吸光度各步骤用超滤管将其浓缩至最终蛋白含量达10mg/mL,加入1/2体积甘油,分装后,-20℃冰冻保存。

1.3.4.4 改良NaIO₄法3

方法同1.3.4.3节,除第2步为醛化HRP溶液加入1mL 0.16mol/L乙二醇溶液混匀后室温放置30min,以灭活NaIO₄,及溶解离心后过Sephadex G-25柱代替透析除去铵离子,其余步骤均相同。

1.3.5 ELISA方法的建立

1.3.5.1 抗原的包被与封闭

将OVA-CL用包被缓冲液稀释为3μg/mL,于已装好的酶标条中每孔加入100μL,置于37℃恒温水浴箱中孵育1h,然后置于4℃冰箱中过夜,洗涤缓冲液洗涤3次,加2%的脱脂奶粉溶液,每孔200μL;置于37℃恒温水浴箱中孵育1h,用洗涤缓冲液洗涤3次,干燥后置于4℃冰箱中保存。

1.3.5.2 酶标抗体工作质量浓度的确定

在已包被3μg/mL抗原的酶标板上加入100μL稀释液,第1孔200μL,并加入1μg/mL以上不同酶标方法标记的酶标抗体,去100μL移至后1孔,至11孔,最后1孔为空白放至37℃水浴恒温箱孵育1h, PBST洗涤3次,加入100μL显色液,37℃显色15min,取出加入50μL终止液结束反应,测其OD值,取其OD最接近1.0的酶标抗体质量浓度作为标准工作质量浓度。

1.3.5.3 直接竞争ELISA标准工作曲线的绘制

在已包被3μg/mL抗原的酶标板上加入100μL稀释度为1500倍的酶标抗体,加至11孔,最后1孔为空白,然后加入纯水倍比稀释的不同质量浓度的CL 50μL,第1孔浓度为1μg/mL,第11孔加入50μL的稀释液,同时做3个重复放置37℃水浴恒温箱孵育1h, PBST洗涤3次,加入100μL显色液37℃显色15min,取出加入50μL终止液结束反应,测其OD值。以lgc(CL)为横坐标,抑制率为纵坐标绘制标准曲线,计算抑制中质量浓度(IC₅₀)与最低检测极限(IC₂₀)^[23]。抑制率(I)按式(6)计算。

$$I/\%=(\text{OD}_0-\text{OD})/\text{OD}_0\times 100 \quad (6)$$

式中:OD₀为不添加抑制物质的对照孔的光密度值;OD为添加了抑制物质孔的光密度值。

1.3.6 ELISA方法评价

1.3.6.1 准确度

加入用阴性尿样配成的不同质量浓度的CL标准工作溶液50μL,其质量浓度分别为400、200、100、50ng/mL,每个质量浓度作6个重复,利用所建立的ELISA方法,按式(7)计算水样回收率。

$$\text{回收率}/\%=\text{检测质量浓度}/(\text{ng/mL})/\text{实际添加质量浓度}/(\text{ng/mL})\times 100 \quad (7)$$

1.3.6.2 精确度

以批内和批间变异系数来ELISA方法的精确度。取同一批次酶标板对同一批次的尿样进行检测,每个样品做4次重复,计算批内变异系数。对不同批次样品进行检测,每个样品做4次重复,计算批间变异系数。

1.3.6.3 特异性

依CL标准曲线绘制方法,添加10种与CL结构类似的药物,查得并计算时各种药物的IC₅₀,按式(8)计算交叉反应率。

$$\text{交叉反应率}/\%=\text{标准样品IC}_{50}/\text{类似物IC}_{50}\times 100 \quad (8)$$

2 结果与分析

2.1 抗体的纯化

2.1.1 各种纯化方法IgG得率

由表1可知,饱和硫酸铵、辛酸、辛酸-硫酸铵、硫酸铵-DEAE这4种纯化方法IgG的得率分别为15.4%、

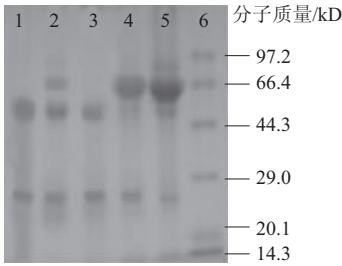
23.6%、15.1%与5.1%。可以看出，辛酸法的IgG得率最高，SAS-DEAE法的回收率最低。

表1 各种纯化方法IgG得率

Table 1 Comparison of different methods for IgG purification

纯化方法	血清体积/mL	纯化前IgG总量/mg	纯化后IgG总量/mg	IgG得率/%
饱和硫酸铵	1	38.93	6.00	15.4
辛酸	1	38.93	9.18	23.6
辛酸-硫酸铵	6	233.58	30.80	15.1
SAS-DEAE	2	77.86	4.00	5.1

2.1.2 IgG纯度鉴定



1. SAS-DEAE法; 2.SAS法; 3.辛酸-SAS法;
4.辛酸法; 5.纯化前抗血清; 6.标准蛋白。

图1 抗体纯化前后SDS-PAGE凝胶电泳图

Fig.1 SDS-PAGE of antibodies before and after purification

各种方法纯化得到的抗体纯度鉴定结果见图1。同标准蛋白条带分布进行比较，原血清的条带较多，其中面积最大的条带为白蛋白之类的杂蛋白，经SAS-DEAE方法纯化的抗血清，与辛酸-硫酸铵方法纯化的抗血清结果相似，已基本除去了IgG以外的杂蛋白，即在凝胶上分别显示一条分子质量约55kD的重链带和约26kD的轻链带。而辛酸法纯化后抗血清则还含有较大量白蛋白，单独使用饱和硫酸铵法纯化时，其色带也有两条以上，说明两种纯化方法效果均不太理想。SAS-DAEA方法操作相对复杂，因此选择辛酸-硫酸铵方法为抗体纯化最佳方法。

2.2 酶标记抗体质量分析

各HRP标记抗体方法的酶结合率见表2。简易NaIO₄法的酶结合率最高，改良NaIO₄法3次之，改良NaIO₄法1与改良NaIO₄法2都较低。

表2 HRP标记结合率

Table 2 Effect of different methods on HRP-antibody conjugation

标记方法	IgG量/(mg/mL)	酶量/(mg/mL)	HRP/IgG	酶结合率/%
简易NaIO ₄	6.56	2.56	1.56	62.4
改良NaIO ₄ 法1	1.63	0.56	1.38	35.8
改良NaIO ₄ 法2	7.25	2.00	1.10	35.8
改良NaIO ₄ 法3	1.46	0.29	0.81	56.1

2.3 ELISA方法的建立

2.3.1 直接竞争ELISA

2.3.1.1 酶标记抗体工作浓度的确定

4种HRP标抗体标准溶液的效价见表3，当OD=1.0

时的稀释倍数分别约为800、2500、8000、1600。稀释倍数越高，说明其效价越高，越节省原料。结合表2和表3可知，酶结合率高抗体的效价不一定高。这可能是由于酶结合率高影响力抗体的活性，导致其亲和力下降。因此，选择改良NaIO₄法2方法制备的酶标抗体用于后续直接竞争ELISA研究。

表3 4种HRP标抗体效价

Table 3 Antibody titers obtained from four NaIO₄ methods

酶标抗体	稀释倍数(×100)							
	2	4	8	16	32	64	128	256
简易NaIO ₄	1.40	1.40	1.09	0.89	0.69	0.41	0.19	0.07
改良NaIO ₄ 法1	1.84	1.84	1.35	1.13	0.74	0.42	0.25	0.14
改良NaIO ₄ 法2	1.84	1.84	1.84	1.53	1.35	1.13	0.87	0.52
改良NaIO ₄ 法3	1.35	1.22	1.22	0.97	0.74	0.47	0.29	0.20

2.3.1.2 直接竞争ELISA标准工作曲线

根据所测OD绘制标准曲线，添加的CL在2.15~1000ng/mL有较好的线性，该曲线的回归方程为： $I=26.84lgc(CL)+8.256$ ， $R^2=0.996$ ，根据回归方程求得CL的IC₅₀=35.9ng/mL，最低检测限为(IC₂₀)2.7ng/mL。

2.3.1.3 准确度

直接竞争ELISA的添加回收率见表4，在尿样添加不同质量浓度的CL后，其回收率在79.0%~120.6%之间，平均回收率为94.2%。

表4 直接竞争ELISA CL检测尿样回收率

Table 4 Recovery of the ELISA method for spiked urine samples

添加CL质量浓度/(ng/mL)	检测质量浓度/(ng/mL)	实际回收率/%
400	371.1	92.8
200	168.8	84.4
100	79.0	79.0
50	62.3	120.6

2.3.1.4 精密度

表5 直接竞争ELISA不同CL质量浓度批内变异系数

Table 5 Intra-assay coefficient CV of the ELISA method

样品质量浓度/(ng/mL)	重复次数(n)	平均值±标准误差	变异系数/%
400	6	415.9±37.6	9.0
200	6	199.5±17.8	8.9
100	6	95.4±6.3	6.6
50	6	49.9±6.1	12.0

表6 直接竞争ELISA不同CL质量浓度批间变异系数

Table 6 Inter-assay coefficient CV of the ELISA method

样品质量浓度/(ng/mL)	重复次数(n)	平均值±标准误差	变异系数/%
400	3	425.3±42.3	9.9
200	3	197.4±29.5	14.9
100	3	96.0±15.6	16.3
50	3	49.7±7.1	14.3

对同一批次样品和不同批次样品进行重复测试，计算批内变异系数和批间变异系数。从表5、6可知，

直接竞争ELISA检测尿样中CL的批内变异系数为6.6%~12.0%，平均变异系数为9.1%；批间变异系数为9.9%~16.3%，批间平均变异系数为13.8%。

2.3.1.5 特异性

表7 酶标抗体与CL类似物的交叉反应

Table 7 Cross-reactivity of the HRP labeled antibodies with clenbuterol analogues

化学物	IC ₅₀ /(ng/mL)	交叉反应率/%
克伦特罗(CL)	36.30	100
肾上腺素(AD)	613.85	5.9
双氯灭痛	>10 ⁵	<0.1
盐酸溴己新	>10 ⁵	<0.1
重酒石酸去甲肾上腺素	>10 ⁵	<0.1
沙丁胺醇	>10 ⁵	<0.1
硫氰酸红霉素	>10 ⁵	<0.1
甲砒霉素	>10 ⁵	<0.1
莱克多巴胺	>10 ⁵	<0.1
氟苯化考	>10 ⁵	<0.1
北里霉素	>10 ⁵	<0.1
乙氧酰胺基苯甲酯	>10 ⁵	<0.1

选择CL的结构类似物如肾上腺素AD、双氯灭痛等结构类似物进行特异性研究。由表7可见，该酶标抗体与肾上腺素交叉反应率最高，为5.9%，与其他类似物几乎无交叉反应。

3 结 论

本实验所确立的抗血清IgG纯化方法是辛酸-硫酸铵法，由于该方法操作比较简便，对于实验仪器设备的要求也不高，主要是需要可以达到一定转速的冷冻离心机，且所得的纯化血清有较高的回收率与纯度。

酶标抗体的最佳方法是改良过碘酸钠法²，但要结合Sephadex G-25柱除去铵离子，既可以缩短时间，又可以避免蛋白在长期的透析过程中变性，保证抗体与酶的活性；然后用超滤膜浓缩并加入一定体积的甘油，有利于保存。

直接竞争ELISA实验结果表明，该方法的回归方程 $I=26.84\lg c(\text{CL})+8.256$ ， $R=0.996$ ，批内变异系数为9.1%，批间变异系数为13.8%，尿溶液的平均回收率为94.2%，与肾上腺素的交叉反应率为5.6%，其他药物极低或没交叉反应。目前，国家对畜禽样品中CL的检测要求一般设为1.0ng/mL。本方法的最低检测质量浓度为2.7ng/mL，后续可以通过制备单克隆抗体、优化ELISA反应条件等提高方法的灵敏度，以适应实际检测需求。

参考文献：

- [1] 张园园, 吴永宁. 克伦特罗的毒性作用及其中毒机制[J]. 卫生研究, 2002, 31(4): 328-330.
- [2] 董昕, 王娟. 盐酸克伦特罗的残留与食品安全[J]. 肉类研究, 2006, 20(12): 37-39.
- [3] 姚小兵, 金福源, 陶艳. 盐酸克伦特罗的危害及其检测技术[J]. 中国畜禽种业, 2010(12): 41-43.
- [4] 赵榕, 吴国华, 涂晓明. 反相高效液相色谱法测定猪肝中盐酸克伦特罗[J]. 中国食品卫生杂志, 2000, 12(2): 22.
- [5] LU J H, HE G Y, WANG X B, et al. An improved LC-MS-MS method for the determination of clenbuterol in human urine[J]. LC GC EUROPE, 2012, 25(11): 612-617.
- [6] 高燕红, 吴西梅. 液质联用快速测定饲料中的莱克多巴胺和克伦特罗[J]. 中国卫生检验杂志, 2005, 15(6): 643-645.
- [7] 谢孟峡, 刘媛, 蒋敏. 固相萃取-气相色谱-质谱分析肉样中盐酸克伦特罗的残留量[J]. 分析化学, 2002, 30(1): 11-15.
- [8] 谢维平, 黄盈煜. 气相色谱法直接测定动物组织中盐酸克伦特罗的残留量[J]. 色谱, 2003, 21(2): 192-196.
- [9] ANGELETTI R, ORIUNDI MP, PIRO R, et al. Application of an enzyme-linked immunosorbent assay kit for β -agonist screening of bovine urines in north eastern Italy[J]. Analytica Chimica Acta, 1993, 275: 215-219.
- [10] DEGAND G, DUYCKAERTS A B, ROGISTER G M. Determination of clenbuterol in bovine tissues and urine by enzyme immunoassay[J]. Journal of Agricultural and Food Chemistry, 1992, 40: 70-75.
- [11] 陈继明, 黄士新, 周光宏. 酶联免疫吸附测定法检测克伦特罗[J]. 中国兽药杂志, 1999, 33(2): 19-22.
- [12] ALDO R, CHIARA M A, FRANCESCO P, et al. A rapid and sensitive 384-microtiter wells format chemiluminescent enzyme immunoassay for clenbuterol[J]. Talanta, 2000, 52(2): 311-318.
- [13] 胥传来, 彭池方, 郝凯, 等. 化学发光酶免疫方法检测克伦特罗残留[J]. 分析化学, 2005, 33(5): 699-702.
- [14] 王硕, 李细芬, 生威, 等. 增强化学发光酶免疫法对猪肉中盐酸克伦特罗的检测[J]. 分析测试学报, 2010, 29(3): 215-219.
- [15] 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.
- [16] ZHANG M Z, WANG M Z, CHEN Z L, et al. Development of a colloidal gold-based lateral-flow immunoassay for the rapid simultaneous detection of clenbuterol and ractopamine in swine urine[J]. Analytical and Bioanalytical Chemistry, 2009, 395(8): 2519-2599.
- [17] 姜艳彬, 孙冠如, 王海, 等. 盐酸克伦特罗胶体金快速检测试纸条的研制[J]. 中国畜牧兽医, 2010, 37(10): 109-113.
- [18] LI Z, WANG Y, KONG W, et al. Ultrasensitive detection of trace amount of clenbuterol residue in swine urine utilizing an electrochemiluminescent immunosensor[J]. Sensors and Actuators B-Chemical, 2012, 174: 355-358.
- [19] 周玉, 李岩松, 潘风光, 等. 小鼠腹水 IgG 类单克隆抗体纯化方法的研究[J]. 黑龙江畜牧兽医, 2006(10): 14-16.
- [20] 刘俊琴, 申丽洁. 辛酸-硫酸铵法在纯化血清旋毛虫特异性 IgG 抗体中的应用[J]. 中国病原生物学杂志, 2008, 3(8): 595-597.
- [21] 于嘉屏, 许绍辉, 张国治. EAE纤维素柱层析法分离 β -N-乙酰氨基糖苷酶同工酶[J]. 第二军医大学学报, 1990, 11(4): 350-351.
- [22] 高艳利, 杨思文, 樊凯奇, 等. SDS-PAGE电泳技术分析蛋白质的研究[J]. 辽宁化工, 2007, 36(7): 460-463.
- [23] HENNION M C, BARCELO D. Strengths and limitations of immunoassays for effective and efficient use for pesticide analysis in water samples: a review[J]. Analytica Chimica Acta, 1998, 362: 3-34.