



动物及动物产品 检验检疫进展

王金洛 主编



中国科学技术出版社

2003 北京国际动物检疫检验技术研讨会

动物及动物产品检疫检验进展

主 编：王金洛

副主编：宋维平 汪 明 李文海

李全录 祝俊杰

中国科学技术出版社

·北 京·

图书在出版编目(CIP)数据

动物及动物产品检疫检验进展:2003 北京国际动物检疫检验技术研讨会论文集 / 王金洛主编. —北京:中国科学技术出版社, 2003. 10

ISBN 7-5046-3691-6

I. 动… II. 王… III. ①兽疫—检疫—国际学术会议—文集 ②畜产品—卫生检验—国际学术会议—文集
IV. S851.34-53

中国版本图书馆 CIP 数据核字(2003)第 092034 号

中国科学技术出版社

北京海淀区中关村南大街 16 号 邮政编码: 100081

电话: 62103204

新华书店北京发行所发行 各地新华书店经售

北京正豪彩色印刷有限责任公司

*

开本: 889 毫米×1194 毫米 1/16 印张: 19 字数: 400 千字

2003 年 10 月第 1 版 2003 年 10 月第 1 次印刷

印数: 1~1000 册 定价: 96.00 元

(凡购买本社的图书, 如有缺页、倒页、
脱页者, 本社发行部负责调换)

加強國內外學校交流
提高動物科技水平
團結廣大科技工作者
為發展我國動物科學
做出新貢獻

中國工程院院士·饒夢

2003.10.5

加强国际合作交流，推
进我国动检事业发展。

卢连山

二〇〇三年九月

精益求精，认真负责，保证动物产品卫生安全。

程望录

2003 北京国际动物检疫检验技术研讨会组织机构

会议组委会

- 顾 问** 沈荣显 (中国工程院院士)
于双墨 (北京畜牧兽医学会理事长)
- 主 席** 刘亚清 (北京市农业局副局长)
- 副主席** 汪 明 (中国农业大学动物医学院院长)
王金洛 (北京市农林科学院副院长)
- 秘书长** 李全录 (北京市兽医卫生监督检验所所长)
- 副秘书长** 梅克义 (北京市农业局畜牧兽医管理处处长)
黄宗洲 (北京畜牧兽医学会副理事长兼秘书长)
宋维平 (北京市农林科学院畜牧兽医研究所所长)
赵德明 (中国农业大学动物医学院副院长)

学术委员会

- 主 任** 王金洛
- 副主任** 汪 明 毛振宾 门常平
- 委 员** 王 琴 杨汉春 李全录 刘 钧
赵德明 宋维平 穆 祥 赖平安
李志荣 何述忠 周 全 陈小玲
龙 塔 高 丰 余锐萍 Eloisa.Jones

2003 北京国际动物检疫检验技术研讨会

《动物及动物产品检疫检验进展》编委会

顾 问 沈荣显 程贤禄 于双墨

主 编 王金洛

副主编 宋维平 汪 明 李文海

李全录 祝俊杰

编 委 (按姓氏笔画排序)

门常平 王金洛 王 琴

龙 塔 刘亚清 刘 钧

刘建华 宋维平 李全录

李志荣 何述忠 汪 明

余锐萍 陈小玲 杨汉春

周 全 赵德明 祝俊杰

姚杰章 梅克义 黄宗洲

赖平安 穆 祥 Eloisa.Jones

前 言

随着全球经济一体化进程的加快，动物及动物产品，特别是动物源性食品安全成为公众和国际社会关注的焦点内容。相关政策、标准、管理体系和检疫检验技术等方面的国际交流日趋重要。我国已经加入 WTO，采用国际标准化已成必然。为了提高我国动物检疫检验水平，推动动物检疫检验尽快与国际接轨，在全国上下积极筹备第 29 届奥运会之际，开展动物检疫检验技术国际合作与交流，研讨我国动物检疫检验体制和机制及其发展方向，对于保障人类健康安全和促进国际贸易发展有着深远的意义。

我国对外开放不断扩大，尤其是加入世贸组织之后，畜产品生产既面临机遇，又面临挑战。从总体上说，我国有悠久的动物养殖历史和经验，又有丰富的物种资源，加上较低廉的劳动成本，畜禽养殖总量和畜产品生产量占世界总量相当大的比例，畜产品是我国具有比较优势的出口产品；但是由于动物防疫和畜产品的质量安全工作基础相对薄弱，现行的检疫检验技术及其管理机制与国外畜牧业发达国家相比还有一定的距离，因此限制了我国畜产品在国际竞争中发挥优势。

以检疫工作来说，我国还未实行发达国家普遍采用的兽医官制度和垂直管理体制，整个兽医检疫队伍技术素质有待提高，经费有待于确定稳定充足的来源，法律法规还需进一步制定具体实施细节，许多标准还要完善。未来的动物检疫不只是单纯的、孤立的动物疾病的检疫，而是以确保动物源性食品安全以及人类健康为总目标的系统管理。WTO 的规则和规定的贸易准则，对我国动物检疫检验已提出了更高的要求。

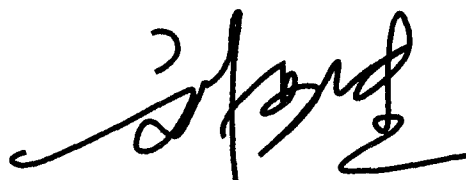
WTO 成员国应严格执行 SPS 协议和 OIE 的相关规定，并科学规范地建立以风险分析和风险评估为基础的动物检疫体系。我国应以这些原则为准，建立完善动物产品的风险分析与评估体系拓展畜产品国际市场，尽快消除制约我国畜产品国际贸易的技术性壁垒。随着国际贸易的不断增长和国内物质生活水平的不断提高，对动物源性食品的标准要求越来越高，为了便于与国际接轨，我国检疫检验标准的制定都在参考国外相关标准，制订和执行高标准必须要依靠先进的科学技术，许多技术方法，如免疫检测技术、基因检测技术、生物芯片技术、生物传感器技术、信息技术，被广泛地应用到动物检疫检验之中，大大提高了动物检疫检验的速度和准确性。

国际间的合作与交流不仅可以提高我国的检疫检验技术水平，而且也是动物检疫检验技术与体制国际化的必然趋势。动物生产及其加工企业只有获得国际认证才具有走出国门的绿色通行证，而认证体制是未来检疫检验机构对企业进行有效监管的方式之一。

畜牧业的可持续发展向绿色、安全畜牧业转变，不仅要处理好残留对人和环境存在的潜在威胁，同时还要解决好有害动物对农业环境的危害，以及现代生物工程生物对农业环境的潜在威胁。总而言之，未来的动物检疫检验是关系到人类健康文明和畜牧业可持续发展的关键环节。

北京市农业局、北京畜牧兽医学会经过多方面协商、联系举办了 2003 年北京国际动物检疫检验技术研讨会，其目的在于加强国际交流的同时又加强了国内间的交流，并探讨我国动物检疫检验在技术与管理上进一步提高的途径。大会共收集论文 80 多篇，经过会议学术委员会的审订，将 60 多篇论文分成专题论述、检疫检验技术、管理体制、安全生产、疾病综合防制 5 个主题出版。这些论文从不同角度探讨了我国动物检疫检验深入发展的问題，对推动我国动物检疫检验事业发展有着重要的参考价值。

2003 国际动物检疫检验研讨会
组 委 会 主 席



2003 年 10 月 8 日

目 录

第一部分 专题论述

- 盐酸克伦特罗(瘦肉精)快速检测试纸条的研制.....张改平等(1)
- 从保障人类安全的角度,重视和做好动物产品安全管理工作.....刘亚清(6)
- Australia's Animal Quarantine and Disease Control Measures for the Summer Games of the XXVIII Olympiad and the XI Paralympic Games in Sydney, September-October 2000 Peter • Thornber (12)
- Rulemaking by the Animal and Plant Health Inspection Service (APHIS) Ted • Williams (27)
- 牛海绵状脑病检测与诊断.....赵德明(31)
- 荧光 PCR 技术及其在活禽、禽肉产品中检测禽流感病毒和中、强毒力新城疫病毒株的应用.....赖平安(37)
- 动物源性食品中有害残留监控技术.....李美同(39)
- 畜禽疫病诊断中免疫酶组织化学染色技术的应用.....刘月焕等(44)

第二部分 检验检疫技术

- 应用免疫组织化学方法检测屠宰猪肝脏中人乙型肝炎病毒抗原.....许江城等(47)
- 用 PCR 检测人工感染鸡蛋及血液等样品中鸡传染性贫血病毒的动态分布.....杨兵等(51)
- 猪瘟免疫失败的主要原因分析.....王琴等(54)
- 肉品卫生快速检验检疫技术的研究及推广应用.....栗绍文等(58)
- 狂犬病的流行和检验检疫技术.....周全等(62)
- 生猪机械化屠宰加工过程中兽医检疫方法.....张冬梅(64)
- 浅谈商品猪的瘫软和外伤对肉品质量的影响.....吕峰(68)
- 宰前检疫在动物防疫工作中的地位、作用及方法.....杜聚朝等(70)
- 对我国生猪屠宰检验检疫的探讨.....周全等(72)
- 略论生猪屠宰过程中宰后检疫的综合判定.....杜聚朝等(76)
- 生猪盐酸克伦特罗残留的检测与执法体会.....蔺长明等(78)
- 盐酸克伦特罗在我国的非法使用及安全评价.....王选年等(80)
- 影响我国动物性食品安全的主要原因及对策.....周德刚等(84)
- 影响动物性食品药物残留的几点思考.....赵勇(88)
- 论药物残留的成因、危害及应对策略.....周祖华(90)

第三部分 检验检疫体制与机制

- 改革和完善我国兽医管理体制 提高动物疫病和动物源性食品安全综合控制能力.....何述忠等(93)
- 北京动物检疫监督回顾与展望.....李全录等(101)
- 以北京市平谷区的改革为例谈基层动物检疫监督管理体制的创建...平谷区兽医卫生监督检验所(110)
- 动物检疫工作中存在的若干问题及探讨.....李志荣(113)
- 兽医管理体制的现状与对策设想.....周全等(117)
- 加强动检监督全面建设的基本做法.....姚国安等(120)
- 湖南省动物检疫承诺制的建立.....李淑云等(123)
- 加强信息技术在动物检疫监督行业中的应用
- 提高动物检疫监督工作的科学化管理水平.....尹用国等(127)
- 北京市兽药生产管理中一些问题的分析.....方晖等(132)
- 关于加强北京市动物检疫监督信息化建设的几点思考.....刘昀等(135)

我国现行体制下兽医法制建设存在的问题和建议.....	周全等 (140)
动物防疫监督综合管理的探索	王卫东等 (142)
动物检疫检验工作探讨	宜学军等 (145)
贯彻《动物防疫法》及其相关法规急需明确的几个问题.....	倪泽成等 (147)
动物检疫工作现状与对策	徐凤云 (150)
我省公路动物防疫监督检查站现状及一些设想	王斌 (153)
巴西应用哨兵动物监测口蹄疫	蔺长明等 (155)

第四部分 动物疫病控制

抗克隆特罗单克隆抗体的研制及其初步应用	王宏飞等 (156)
二温式多重 PCR 同时检测鉴别对虾白斑综合征病毒和桃拉病毒的研究	谢芝勋等 (161)
醴陵市猪伪狂犬病流行情况调查和预防措施初探.....	赵光政等 (165)
溶血性曼氏杆菌 (<i>Mannheimia haemolytica</i>) PCR 检测方法的研究	张培君等 (169)
禽流感 (H ₅ 亚型) 免疫程序的试验研究及推广	赵景义等 (173)
彩虹鲷致病性运动气单胞菌的分离鉴定与药敏试验.....	彭开松等 (179)
朊病毒免疫学诊断技术研究进展	王小军等 (184)
对 11 种市售抗犬瘟热病毒生物制品抗体效价的检测.....	邱立新等 (188)
朊病毒发现的历史概况	王小军等 (193)
犬瘟热实验室诊断技术研究进展	王宏俊等 (199)
禽流感病毒夹心 ELISA 快速检测方法的研究	肖运才等 (205)
猪瘟感染的新动向及其防治	赵景义等 (211)
非典型性猪瘟诊断与技术推广	马荣华 (214)
湖南省规模养猪场主要疫病流行情况调查研究	刘道新等 (219)
浅谈囊虫病快速诊断技术推广与应用	赵辉等 (224)
动物传染病综合防控初探	奚增禄等 (228)
规模化饲养兔病发生的特点及综合防制技术推广.....	王景波等 (231)
浅谈中西医结合防治牛羊焦虫病	马荣华等 (233)
“假母鸡”产生的原因及其防治	赵景义等 (237)
浅谈流感病毒在禽类和低等哺乳动物中的传播及对人类健康的危害.....	王旭红等 (239)
试述如何加强我区的产地检疫工作	王永清等 (242)
蓬勃发展的内蒙古动物防疫监督事业	郭荡茹等 (244)

第五部分 动物安全生产

肉仔鸡日粮中添加大豆降解肽的初步研究	宋维平等 (247)
肉鸡饲养场 HACCP 体系的建立与实施	王建诚等 (251)
无公害猪肉生产技术探讨	刘子芝 (262)
“无药残肉鸡”饲养模式探讨	陈祥庶等 (266)
HACCP 在生猪屠宰加工企业中的应用	周全等 (272)
浅谈保证畜产品安全重要手段	平谷区兽医卫生监督检验所 (276)
从源头把关 确保动物产品安全	陈建国 (279)
关于对动物检疫与动物产品安全的探讨	苗儒等 (281)
加入 WTO 与水产品食用安全	周爱萍等 (284)
餐饮行业食品安全管理	赵勇等 (286)

盐酸克伦特罗（瘦肉精）快速检测试纸条的研制

张改平¹ 王选年² 杨艳艳¹ 周全³ 杨继飞¹ 邢广旭¹

李青梅¹ 赵东¹ 侯继波⁴ 施彬³ 康晓笛⁵

(1.河南省农业科学院生物技术研究所; 郑州 450002; 2.浙江大学动物科学学院, 杭州 310029;

3.上海兽医卫生监督管理所, 上海 200232; 4.江苏省农业科学研究所, 南京 210014;

5. 河南百奥生物工程有限公司, 郑州 450002)

摘要 本研究以胶体金标记克伦特罗 (CL) 单克隆抗体竞争性膜层析技术研究成功了猪尿液中 CL 残留检测的快速检测试纸条。该试纸条由测试端、显色区和手柄端 3 部分构成, 含有支撑层和反应试剂吸附层, 可在 8~10min 完成测试, 且无需任何仪器设备, 具有敏感、特异、快速、简便的特点。通过检测 0, 0.1, 0.3, 0.9, 2.7, 8.1ng/mL 系列 CL 标准品, 用光密度阅读仪判读, 该试纸条的最低检测限可达 0.1ng/mL, 相对光密度 (ROD) 半数抑制浓度 IC₅₀ 为 1.78 ± 0.17ng/mL。尿液基质对试纸条的检测无特定影响, 肉眼判定检测限可达 1ng/mL, 在 2.7ng/mL 时检测线显色显著抑制。CL 快速检测试纸条可在不同检测精度范围内实现猪尿液中 CL 残留的定量、半定量或定性检测。

关键词 克伦特罗 试纸条 胶体金 免疫层析 快速检测

克伦特罗 (Clenbuterol, CL), 俗称“瘦肉精”, 是一种人工合成的 β_2 -肾上腺素受体激动剂 (β 兴奋剂), 具有扩张支气管平滑肌的作用, 常用于防治哮喘、肺气肿等肺部疾病。当其使用剂量达到治疗量的 5~10 倍时, 具有能量重分配作用, 可使胴体肌肉合成增加, 脂肪沉积减少^[1]。常被作为饲料添加剂违禁用于动物生产之中^[2], 造成动物性食品中“瘦肉精”的残留, 引起中毒事件不断发生^[3-7], 给食用者的健康造成极大危害。因此, 各国政府都禁止 CL 作为饲料添加剂用于肉用动物的生产之中, 我国政府也规定严禁在饲料中添加 CL, 同时制订了 CL 的最高残留限量标准^[8]。为了建立快速、敏感、特异的 CL 免疫检测方法, 本研究应用 CL 单克隆抗体胶体金标记膜层析技术建立了 CL 快速检测试剂条。

1 材料和方法

1.1 材料

1.1.1 主要试剂

实验用水为重蒸去离子水; 盐酸克伦特罗 (Clenbuterol Hydrochloride, CL), Sigma 产品, 分子量 313.68Da, 纯度 ≥ 95%; 氯金酸, 柠檬酸三钠, Tris 碱, Tween-20, FLUKA 产品; BSA, BDH 产品; 硝酸纤维素膜, Millipore 公司; protein G 层析柱, Amersham 产品。

1.1.2 仪器设备

蛋白核酸分析仪, Beckman 公司; GS-15R 冷冻离心机, Beckman 公司; 倒置生物显微镜, LEICA 公司; CM-4000 斩切机, XYZ-3000 点膜仪, TSR-3000 阅读机, Bio-Dot 公司。

1.2 方法

1.2.1 结合抗原的合成及单克隆抗体的制备

用重氮化法将半抗原 CL 偶联于载体蛋白 BSA 和 OVA, 形成偶联抗原 BSA-CL 和 OVA-CL^[9]。制备过程如下, 取 5mg CL 溶于 0.01mol/L HCl, 并预冷至 0~5℃, 加入 10mg NaNO₂, 4℃ 搅拌 6h。然后加入 20mg BSA 或 OVA (预先溶于 0.1mol/L 磷酸盐缓冲液, pH8.6), 4℃ 继续搅拌 6h。用葡聚糖凝胶 Sephadex G-25 凝胶过滤纯化偶联物 BSA-CL 和 OVA-CL, 用于动物免疫和单抗筛选。

CL 单克隆抗体 C4G1 由本研究室制备^[10]。以 BSA-CL 免疫 8 周龄 Balb/c 小鼠 50 μ g/只, 首次免疫

应用 FCA 乳化抗原，加强免疫应用 FIA 乳化抗原，共免疫 2~3 次，每次免疫间隔 2~6h。当间接 ELISA 检测抗 CL 血清抗体效价 $<10^{-4}$ 时应用 50 μ g 纯抗原尾静脉超强免疫，取脾细胞与 NS0 细胞在 50% PEG 作用下进行细胞融合，HAT 选择培养基培养，以 OVA-CL 进行阳性克隆筛选，经产小鼠腹腔诱生腹水，protein G 柱层析提纯 IgG。

1.2.2 胶体金的制备及单克隆抗体标记

用重蒸去离子水溶解氯金酸，加入 1% 柠檬酸钠溶液，混匀，煮沸并冷至室温，制备胶体金颗粒。测定标记单抗的最适蛋白浓度后，在微量离心管中加入 C4G1 单抗 IgG(1mg/mL)、胶体金、胶体金稀释液，室温静置并 4 $^{\circ}$ C 过夜，离心弃去上清；用稀释液重复两次重悬沉淀即得胶体金标记 CL 单抗。

1.2.3 CL 快速检测试纸条的制备及原理结构

CL 快速检测试纸条根据竞争性抗原抗体膜层析原理设计，由测试端、显色区和手柄端 3 部分构成，含有支撑层和反应试剂吸附层（图 1-a）。测试端含有 CL 金标单抗纤维层和 CL 竞争物纤维层；显色区为纤维素膜层，其上含有判定检测结果的检测印迹和对照印迹，分别为抗 CL 竞争物单克隆抗体和羊抗鼠 IgG 多克隆抗体；手柄端内含吸水材料层。

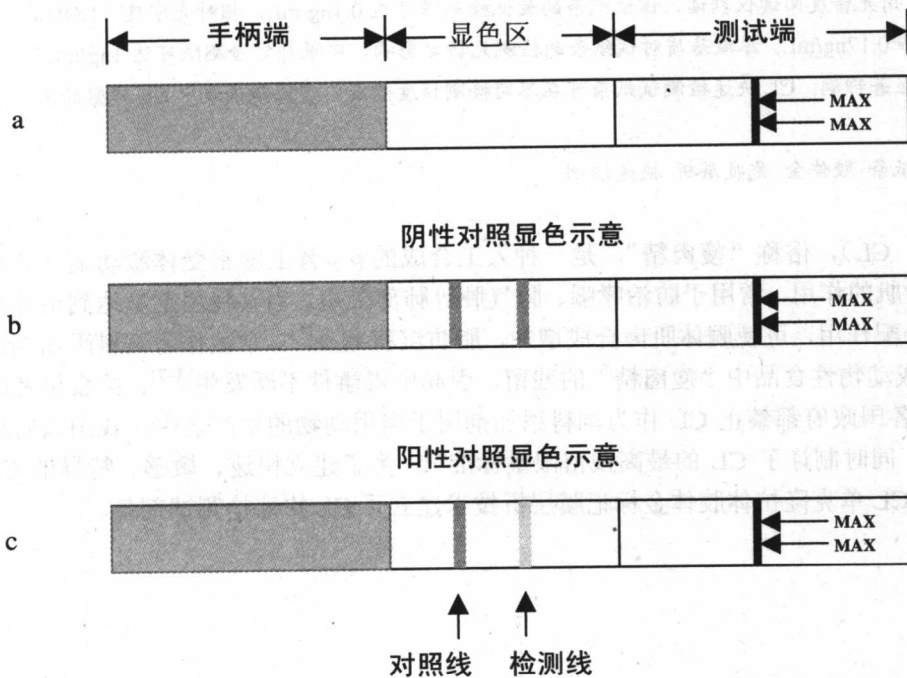


图 1 CL 快速检测试纸条结构及显色示意图

若待测样品溶液中不含 CL 残留物，当样品溶液进入测试端，其中 CL 竞争物与 CL 金标单抗形成 CL 竞争物-金标 CL 单抗复合物，复合物在纤维素膜上层析泳动，被检测印迹处的抗 CL 竞争物单抗拦截，形成 CL 竞争物单抗-CL 竞争物-金标 CL 单抗复合物，并在该印迹处形成棕红色的条带（检测线）；测试端多余的金标 CL 单抗在纤维素膜上继续层析可被对照印迹羊抗鼠 IgG 单克隆抗体捕获形成棕红色的对照条带（对照线）（图 1-b）。当待测样品溶液中含有 CL 残留物时，在测试端样品中 CL 与 CL 竞争物共同竞争 CL 金标单抗，从而使检测印迹处 CL 竞争物单抗-CL 竞争物-金标 CL 单抗复合物的形成减少，而形成颜色较浅的棕红色印迹，多余的金标 CL 单抗继续层析在对照印迹处形成对照线（图 1-c）。根据该反应模式，检测线颜色深浅与样品中 CL 含量呈负相关，即检测线颜色越浅表示样品中 CL 含量越高。

1.2.4 CL 快速检测试纸条的操作方法

检测猪尿液时，样品不需特殊处理，可直接用于检测。若尿液中有污染或杂质可经离心沉淀或过滤后进行检测。检测时取猪尿液样品 80~100 μ L 置于微孔板或小离心管中，然后将试纸条顺序插入其中，

8~10min 取出观察结果。同时，作阴性对照和标准阳性对照检测。

1.2.5 CL 快速检测试纸条的敏感性测定

准确配制 1mg/mL CL 溶液，用 PBS 稀释成浓度为 0, 0.1, 0.3, 0.9, 2.7, 8.1 ng/mL 系列标准品。用 CL 快速检测试纸条测试该标准品中 CL 含量，作 3 份平行试验，检测结果用试纸条阅读仪判读，自动选择基线去除本底。结果以检测线光密度扫描峰 (G/Peak) (图 2) 的相对光密度 (ROD) 的像素 (pixel) 表示，并作 ROD 与标准品浓度对数的标准曲线 (图 3)，计算半数抑制浓度 (IC50)。同时，用阴性猪尿液稀释标准品，检测生物基质对检测的影响。

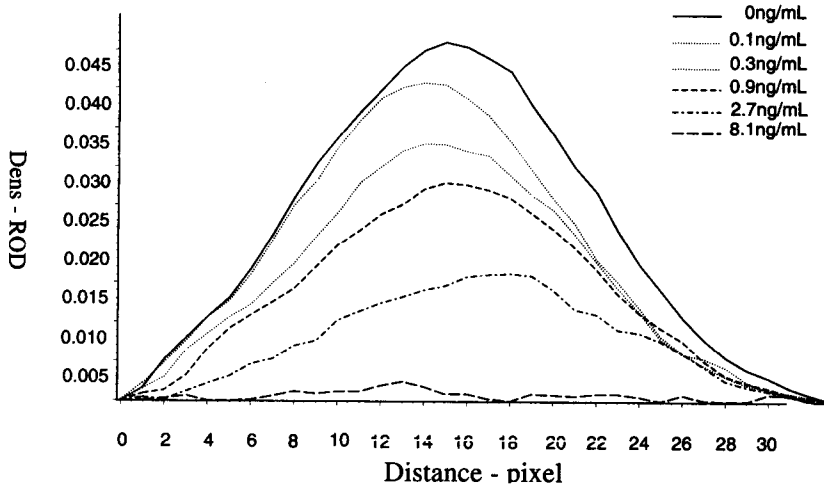


图 2 CL 快速检测试纸条检测标准品的光密度扫描曲线

2 结果

2.1 CL 快速检测试纸条的标准配置和结果判定

商品化的 CL 快速检测试纸条由河南百奥生物工程有限公司生产，标准配置包括：CL 检测试纸条，0 ng/mL 标准品，5ng/mL 标准品，检测微孔板，试纸条固定板和说明书等。结果判定可用试纸条阅读仪或肉眼观察。检测时，设 0 ng/mL、5ng/mL 标准品对照，8~10min 判定结果，标准品和待检样品对照线位置均应呈现一条较明显的棕红色条带，说明试纸条工作正常。0 ng/mL 标准品的检测线呈一条较清晰的棕红色线，5ng/mL 标准品检测线明显浅于 0ng/mL 的检测线。待检样品中瘦肉精的含量根据其检测线

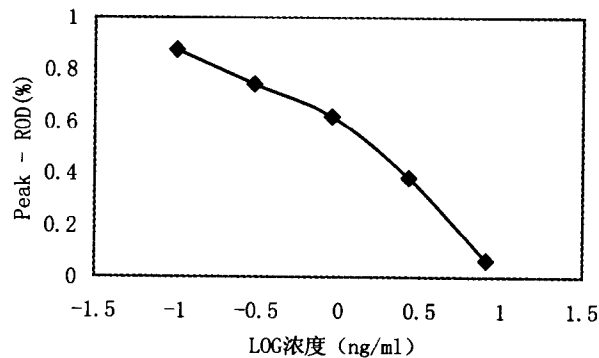


图3 CL试纸条定量检测标准曲线

与标准品检测线颜色对比判定结果，颜色越浅瘦肉精含量越高。

2.2 CL 快速检测试纸条检测的标准曲线

图 2 为系列标准品用试纸条阅读仪扫描的光密度曲线。从图中可明显看出随着样品中克伦特罗含量

升高, 光密度曲线的峰高和峰面积逐渐减小。标准品检测的浓度与光密度曲线峰高(G/Peak)、峰面积(G/D × A) 的测量值见表 1。

表 1 CL 试纸条检测标准品光密度扫描曲线的峰高与峰面积 (单位: 像素 Pixel)

标准品浓度 (ng/mL)	峰面积相对光密度 G/D × A - ROD	峰高相对光密度 G/Peak - ROD
0	51.859 ± 8.320	0.0413 ± 0.0063
0.1	44.941 ± 5.678	0.0362 ± 0.0064
0.3	38.847 ± 2.760	0.0307 ± 0.0030
0.9	32.329 ± 3.877	0.0257 ± 0.0016
2.7	20.094 ± 0.033	0.0158 ± 0.0006
8.1	1.987 ± 0.358	0.0027 ± 0.0003

2.3 CL 快速检测试纸条的敏感性测定

以标准品浓度的对数为横坐标, 光密度曲线峰高对 0ng/mL 标准的相对百分数为纵坐标作标准曲线 (图 3)。图中可见 CL 快速检测试纸条在 0~8.1ng/mL 范围内线性关系良好。用光密度阅读机判读时最低检测限可达 0.1ng/mL。根据曲线计算 CL 试纸条检测克伦特罗光密度半数抑制浓度 IC50 为 1.78 ± 0.17ng/mL。

2.4 尿液基质对 CL 快速检测试纸条的影响

以阴性猪尿液稀释 CL 配制 0, 1.0, 8.0ng/mL 标准品, 用试纸条检测, 光密度阅读仪判读结果见图 4。可见, 尿液基质对试纸条检测没有特定影响。用肉眼观察判定检测结果在 1.0ng/mL 时检测线显色有显著抑制。

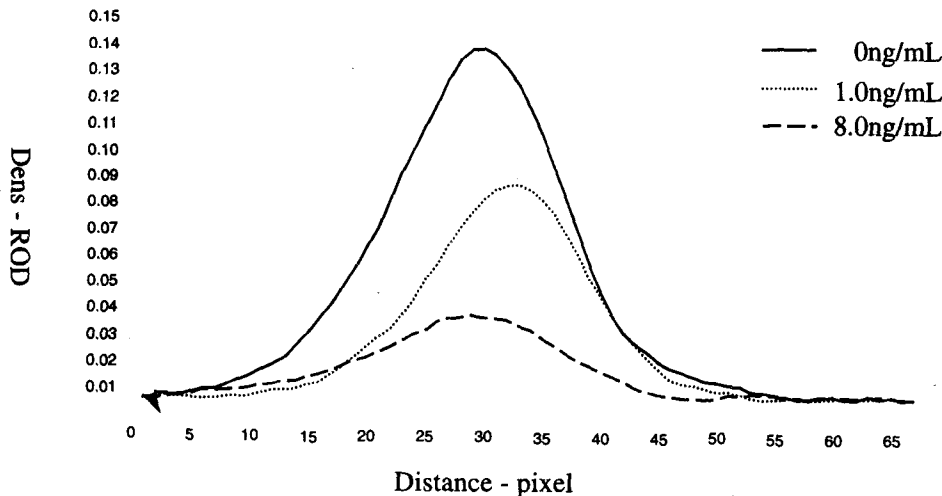


图 4 尿液基质对 CL 试纸条检测的影响

3 讨论

盐酸克伦特罗 (瘦肉精) 是一种 β-兴奋剂, 主要用于肺部疾病的治疗。到目前为止没有任何一个国家批准该类药物用于动物生产之中, 但长期以来一直存在着非法使用, 并造成严重的食物中毒事件^[3-7]。因此, 在肉用动物中应用 β-兴奋剂的残留检测研究一直是人们关注的焦点问题。

用于 β-兴奋剂残留检测的方法主要有理化检测法和免疫学检测法。理化检测法主要有高压液相色谱法 (HPLC)^[11], 气相色谱/质谱联用 (GC/MS)^[12]及近年来发展起来的液相色谱/质谱联用 (LC/MS)^[13]等。这些方法常作为检测的 CL 的确证方法, 具有灵敏、准确、特异等优点。但是, 存在检测方法复杂, 费用昂贵, 且需要专门的检测设备和专业的工作人员。因此, 大大限制了其应用范围, 不能满足日常工

作中大量的筛选检测。免疫学检测方法主要包括放射免疫测定法 (RIA)^[14]、酶免疫测定法 (EIA) 或酶联免疫吸附测定法 (ELISA)^[15]、荧光免疫测定法 (FIA)^[16]等分析方法。这些方法具有快速、简便、灵敏、特异等优点,常作为 CL 检测的筛选法,但仍不能适应现场检测的需要。

本研究应用具有我们自主知识产权的专利技术^[17-19]采用 CL 单克隆抗体胶体金标记免疫膜层析技术 (IC) 设计组装成功 CL 快速检测试纸条。应用该技术检测猪尿液中的 CL 残留的检测时间为 8~10min,较 2~3 个工作日完成的理化检测法或 2~3h 完成的免疫检测法的检测时间大大缩短,真正实现了 β -兴奋剂的快速检测并可以满足现场检测的要求。

我国农业部颁布的行业标准《猪尿液中克伦特罗检测方法——酶联免疫吸附测定法》(农牧发[2001]38号)规定 ELISA 为检测猪尿液中 CL 残留的筛选法,其检测限为 1ng/mL,低于此限度为未检出,超过此限度时为可疑样品。农业部标准《动物组织中盐酸克伦特罗的测定气相色谱-质谱法》(NY/T468-2001)规定了 GC/MS 法为测定动物组织中盐酸克伦特罗残留的确证方法,该方法的最低检出限为 2ng/g。应用 CL 快速检测试纸条测试系列标准品的光密度扫描试验,测得该试纸条用光密度阅读机判读时最低检测限可达 0.1ng/mL,光密度半数抑制浓度 IC₅₀ 为 1.78±0.17ng/mL,肉眼判定检测限可达到 1ng/mL,在 2.7ng/mL 时检测线显色明显抑制。本试纸条在不同应用范围内可实现定量、半定量或定性检测。

CL 快速检测试纸条检测方法属于免疫学测定法,其检测特异性是由针对检测物的抗体的特异性决定的。本研究应用的单抗与 CL 具有很高的专一性,同其他 β -激动剂类如沙丁胺醇、来克多巴胺、肾上腺素、去甲肾上腺素和异丙肾上腺素无交叉反应性,对畜禽常用的抗生素及多种维生素亦无交叉反应性^[10]。

尿液基质对 CL 试纸条检测的敏感性和特异性没有特殊影响。该试纸条可适用于多种场合快速检测猪尿液中 CL 残留的要求。应用该试纸条对其他动物或其他组织中 CL 残留检测时应根据具体情况设计样品净化方案和检测程序。

4 结论

本研究以胶体金标记免疫膜层析 (IC) 技术应用 CL 单克隆抗体率先在国内外研制成功了具有自主知识产权的 CL 快速检测试纸条。该方法具有快速、敏感、特异、简便的特点,可在 8~10min 完成猪尿液中 CL 的残留检测,用光密度阅读仪判读时最低检测限可达 0.1ng/mL,光密度半数抑制浓度 IC₅₀ 为 1.78±0.17ng/mL,肉眼判定检测限可达到 1ng/mL,2.7ng/mL 时检测线显色明显抑制,8.1ng/mL 时检测线完全抑制。该试纸条可在不同检测精度要求范围内实现定量、半定量或定性检测。

参考文献

- 1 Mersmann HJ. Overview of the effects of β -adrenergic receptor agonists on animal growth including mechanisms of action. *J Anim Sci*, 1998, 76: 160~172
- 2 Kuiper HA, Noordam MY, Van Dooren-Flipsen MMH, et al. Illegal Use of β -adrenergic Agonists: European Community. *J Anim Sci*, 1998, 76: 160~172
- 3 Martinez-Navarro JF. Food poisoning related to consumption of illicit β -agonist in liver[J]. *Lancet*.1990; 336:1311
- 4 Salleras L, Dominguez A, Mata E, et al. Epidemiologic study of an outbreak of clenbuterol poisoning in Catalonia, Spain[J]. *Public Health Rep*. 1995, 110(3): 338~342
- 5 Pulce CD, Lamaison D, Keck G, et al. Collective human food poisonings by Clenbutenol residues in Veal liver[J]. *Vet Hum Toxicol*. 1991, 33:480~481
- 6 王选年, 康晓迪, 潘耀谦等. 盐酸克伦特罗的残留及检测. *动物医学进展*, 2002, 22(3): 41~46
- 7 王选年, 张改平. 盐酸克伦特罗在我国的非法使用及安全评价. *中国畜牧杂志*, 2003 (待发表)
- 8 中华人民共和国农业部. 动物性食品中兽药最高残留限量. 1997.9.4. 农牧发[1997] 7号