



# 基于酶联免疫法检测盐酸克伦特罗的微流控系统

穆莉莉<sup>1</sup>, 沙梦梦<sup>1</sup>, 叶嘉明<sup>2,3\*</sup>

(1.安徽理工大学, 淮南 232001; 2.浙江清华长三角研究院萧山生物工程中心, 嘉兴 314006; 3.国家食品安全风险评估中心应用技术合作中心, 嘉兴 314006)

**摘要:** 基于微流控技术和酶联免疫法的原理建立动物性食品中盐酸克伦特罗残留的检测技术, 确保食品安全。设计制作的微流控芯片结合搭建的微流控酶联免疫实验平台, 可以实现对动物性食品中盐酸克伦特罗的现场、简便、快速的免疫反应和检测。结果表明: 通过在芯片上包被盐酸克伦特罗抗原, 由实验平台自动完成进样、清洗过程, 30 min内即可实现对盐酸克伦特罗的快速检测。标准品检测范围为(0.10~8.10)ng/mL, 加标回收率在95.5%~107.3%之间。使用微流控盐酸克伦特罗残留检测芯片系统, 具有快速、自动化程度高、灵敏度高、成本低、方法学性能良好等优势, 特别适用于非专业人士进行盐酸克伦特罗残留的现场、快速检测。

**关键词:** 微流控芯片; 盐酸克伦特罗; 酶联免疫吸附法; 快检

中图分类号: TS 207.3 文献标志码: A 文章编号: 1005-9989(2017)11-0322-04

DOI:10.13684/j.cnki.spkj.2017.11.061

## Microfluidic system for clenbuterol detection based on enzyme-linked immunosorbent assay

MU Li-li<sup>1</sup>, SHA Meng-meng<sup>1</sup>, YE Jia-ming<sup>2,3\*</sup>

(1. Anhui University of Science & Technology, Huainan 232001; 2. Yangtze Delta Region Institute of Tsinghua University, Biotechnology Center on Xiaoshan, Jiaxing 314006; 3. China National Center for Food Safety Risk Assessment, Cooperation Center for Application Technology, Jiaxing 314006)

**Abstract:** A method was established for the clenbuterol detection in animal products based on the microfluidic technology and enzyme-linked immunosorbent assay in order to ensure food safety. By coupling with an experimental platform, the chip could provide a simple, easy to use for rapid detection of the clenbuterol in animal products. Due to envelop the clenbuterol antigen in the microfluidic chip, and complete the process of washing and sampling automatically through experimental platform, the detection could be achieved within 30 min. The detection range of sample concentration was between 0.10 ng/mL and 8.10 ng/mL, the recoveries of clenbuterol in swine urine were in the range of 95.5% to 107.3%. The method for the detection of clenbuterol based on the microfluidic is simple, rapid, highly sensitive and low cost, and has a good performance of methodology, which is particularly suitable for on-site, rapid

收稿日期: 2017-04-30

\*通讯作者

基金项目: 安徽省自然科学基金项目(1308085ME75); 安徽省教育厅自然科学基金项目(KJ2013A086)。

作者简介: 穆莉莉(1973—), 女, 博士, 教授, 研究方向为微流体系统及微化学反应。



detection by non-professionals.

**Key words:** microfluidic chip; clenbuterol; enzyme-linked immunosorbent assay; rapid detection

盐酸克伦特罗(Clenbuterol, CL)属于 $\beta$ -兴奋剂类药物,可提高胴体的瘦肉率,作为饲料添加剂使用。当超过人用药剂量10倍时,饲养家畜才能显著地提高瘦肉率。人食用了含有CL残留的动物性食品,会出现呕吐、四肢无力等不同程度的中毒症状,严重的可导致死亡<sup>[1]</sup>。

针对食品中CL的检测,目前主要的方法共分为两大类:一类是精密设备定量分析方法<sup>[2]</sup>,包括气相色谱-质谱联用法、液相色谱-质谱联用法和高效液相色谱法;另一类是现场快速检测方法<sup>[3]</sup>,包括酶联免疫法、胶体金免疫检测试纸条法等。其中精密设备定量分析方法费用昂贵、步骤复杂、检测时间长,对操作人员有一定要求,难以进行快速、实时、大批量的检测。现场快速检测方法中的试纸条法虽然具有成本低廉、检测时间短及操作方便的优点,但是该方法检出限低,灵敏度不高,需要上述精密仪器定量分析方法的进一步验证。酶联免疫法(Enzyme-linked immunosorbent assay, ELISA)由于灵敏度高、特异性高、成本低等优点,成为目前瘦肉精检测方法中较为常用的一种方法<sup>[4]</sup>。然而,传统的ELISA检测时间长、操作复杂,并且易受人为、环境等因素的影响<sup>[5]</sup>。

微流控技术可以把化学、流体物理、微电子等科学和技术集成于厘米量级的芯片上<sup>[6]</sup>。微流控技术具有试剂消耗量少、检测时间短、自动化程度高、制作成本低等特点,已逐步被应用在食品安全领域,成为食品科学研究的热点,展现出广泛的应用研究价值<sup>[7]</sup>。

本文基于微流控芯片的制作成本低、反应时间短、试剂消耗量少、自动化程度高且与外界环境无接触等特点,结合ELISA的灵敏度、特异性、检出限高等优势,设计了微流控芯片,并搭建了基于ELISA的盐酸克伦特罗微流控检测平台。

## 1 材料与试剂

### 1.1 材料与试剂

光学级聚甲基丙烯酸甲酯(Poly methyl methacrylate, PMMA)板材、光学级聚苯乙烯(Polystyrene, PS)板材、光学级双面胶:上海佰

芯生物科技有限公司;偶联盐酸克伦特罗抗原(CL-BSA, 5 mg/mL)、酶标抗体工作液、标准品溶液、底物液、终止液:上海羽朵生物科技有限公司。

### 1.2 仪器与设备

YoungLaser-V12型二氧化碳激光芯片雕刻机:苏州扬清芯科技有限公司;U-2900型分光光度计:日立公司;JA1203B型电子天平:上海精科实业有限公司;KFSHA2B03G型蠕动泵:卡川尔流体科技有限公司;Q22XD-1.2L微型电磁阀二位三通:上海建红有限公司;12V PTC恒温发热片:广州建龙电器有限公司。

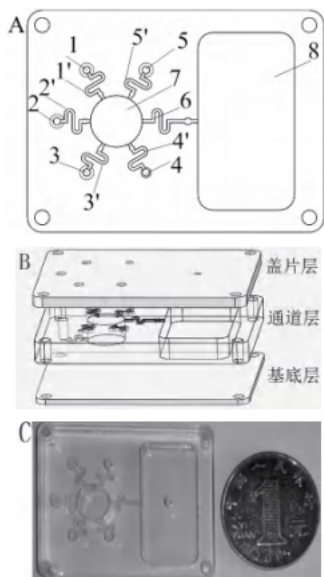
### 1.3 方法

**1.3.1 检测原理** 本论文采用间接竞争ELISA作为微流控系统检测尿样和组织等样本中CL的基本检测方法<sup>[8]</sup>,基本过程为:首先微流控芯片的反应池内预包被CL-BSA,将微流控芯片固定到自制的恒温微流控酶联免疫反应平台上,使用移液枪向芯片滴加样品,由平台自动完成进样和洗涤过程。终止反应后,取出芯片,轻轻振荡摇匀,由分光光度计检测吸光度值。吸光度值的检测结果会随着样品中CL浓度的提高而降低,与标准曲线进行比较即可得出CL含量<sup>[9]</sup>。

**1.3.2 芯片的设计与制作** 如图1A所示,微流控芯片由试剂入口A~D和进样入口、微流体通道a~f、反应池和废液池组成。S形微流体通道的宽度为0.4 mm,深度为0.4 mm。反应池直径7 mm,深度3.7 mm。如图1B所示,微流控芯片采用三层结构,底层为厚度0.5 mm的基层,中间层为厚度为3.5 mm的通道层,顶层为厚度2 mm的盖片层。其中盖片层和中间层的材料是PMMA,底层的材料是PS。试剂入口A~D分别连接外部泵阀系统的酶标抗体工作液瓶、洗涤液瓶、底物液瓶和终止液瓶。微流体通道b位于通道层的下方,其余微流体通道a、c~f位于通道层的上方。

**1.3.3 实验平台的搭建** 为了便于微流控芯片进行食品中盐酸克伦特罗残留的现场快速检测,本文搭建了一套基于微流控技术的恒温酶联免疫反应实验平台,基本组成包括微流控芯片、恒温平台、控制系统及4个进样模块<sup>[10]</sup>。如图2所示,每一个进样模块分别单独与芯片的试剂入口连接。





注: 1.试剂入口A; 2.试剂入口B; 3.试剂入口C; 4.试剂入口D; 5.进样入口; 1'.微流体通道a; 2'.微流体通道b; 3'.微流体通道c; 4'.微流体通道d; 5'.微流体通道e; 6.微流体通道f; 7.反应池; 8.废液池。

图1 微流控芯片原理图(A)、立体图(B)和实物照片(C)

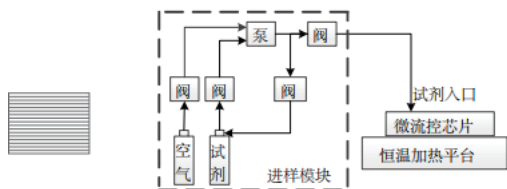


图2 模块组成示意图

## 2 结果与分析

### 2.1 芯片的结构设计及封装

根据间接竞争ELISA法的原理,在微流控芯片上设有4个试剂入口和1个进样入口,与反应池之间用S形微流体通道连接<sup>[11]</sup>。由于光程会对光学检测结果的精度有较大的影响,根据朗伯比尔定律,当光程变长时,会提高其检测灵敏度,降低检出限。综合考虑试剂的消耗量、检测的精度以及芯片的材料成本,选择圆形反应池的厚度为3.7 mm(其中通道层3.5 mm,2层双面胶0.2 mm)、直径7 mm,体积为142 μL。

· 324 ·

考虑到高温条件下,偶联盐酸克伦特罗抗原容易失活,本实验采用基于双面胶的室温贴合法<sup>[12]</sup>。共需2个步骤,基底层和通道层首先完成键合,进行包被偶联抗原,之后再与盖片层键合。

### 2.2 微泵阀系统的定量进样测试

反应试剂能精确、定量地进入芯片反应池是保证酶联免疫反应重复性的前提条件。实验平台通过控制微泵阀开关时间来获得试剂的进样量,使用流量为1 mL/min的微型蠕动泵,可以保证试剂定量、稳定进入反应池,又不会进入废液池,进而确保试剂充分反应。考虑到蠕动泵在运作时会产生脉动,所以需要测出单个脉动的时间及运输的液体量。具体方法为:单个脉动运输的液体量等于一定时间内总液体量除以脉动次数,单个脉动的时间等于总时间除以脉动次数。

经多次实验测出单个脉动的时间为1.15 s,运输的流量为22.5 μL。为了考察1.15 s是否准确且能满足实验要求,进行了如下测试:进样时间t(微泵阀开关时间)设置为1.15 s,重复6次实验,根据称重法获得进样量分别为22.5、23、22.5、22、22.5、23 μL,其相对标准偏差为1.7%。

因此为获得45 μL的终止液,将进样时间t设置为2.3 s,重复6次实验,得到进样量分别为45、46、44、44、45、44 μL,其相对标准偏差为1.8%。为获得90 μL的底物液和酶标抗体工作液,进样时间t设置为4.6 s,重复6次实验,得到进样量分别为89、88、91、90、92、93 μL,其相对标准偏差为2.1%。说明微泵阀系统设计满足检测需求。

### 2.3 百分吸光度标准曲线测定

$$\text{百分吸光度值}(\%) = B/B_0 \times 100$$

式中: B为标准溶液或样本溶液的平均吸光度值;  
B<sub>0</sub>为0 ng/mL标准溶液的平均吸光度值。

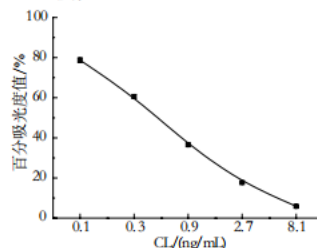


图3 盐酸克伦特罗标准曲线



分别配制浓度为0、0.1、0.3、0.9、2.7、8.1 ng/mL的盐酸克伦特罗标准品溶液,对其进行分析检测(6次重复)<sup>[13]</sup>。横坐标为盐酸克伦特罗标准品的浓度,纵坐标为百分吸光度值,在半对数坐标上绘制标准曲线(见图3)。标准品检测范围为(0.10~8.10)ng/mL,拟合方程为 $y=-16.72\ln(x)+36.799$ ( $R^2=0.9886$ )。

#### 2.4 加标回收率测定

为了检验实验平台及芯片的稳定性,进行加标回收率实验<sup>[14]</sup>。取清亮空白猪尿样,每份添加一定量的CL标准品溶液,使最终质量浓度为0.2、0.6、1.8、3.6、7.2 ng/mL。每个浓度重复5组实验,测得盐酸克伦特罗的回收率在95.5%~107.3%之间,相对标准偏差在3.6%~6.2%之间,结果见表1。

表1 猪尿样品中盐酸克伦特罗添加回收率

添加浓度/(ng/mL)	测定浓度/(ng/mL)	回收率/%	相对标准偏差/%
0.2	0.191	95.5	5.4
0.6	0.578	96.3	3.6
1.8	1.932	107.3	6.2
3.6	3.546	98.5	4.8
7.2	7.284	101.2	5.6

#### 2.5 方法对比

与传统ELISA试剂盒方法相比较,本文提出的微流控芯片以及平台有以下优势<sup>[15]</sup>:系统配置恒温功能,避免环境温度的影响;检测所需时间仅为30 min,缩短了至少15 min;微流控芯片成本低、工艺简单,且易于大批量生产;实验操作简单,自动化程度高,无需专业人员即可进行现场快速检测。

#### 3 结论

本文提出一种基于间接竞争ELISA方法用于CL现场快速检测的微流控芯片及酶联免疫平台。实验结果表明,该检测方法的最低检测限可达到0.1 ng/mL,样品加标回收率在95.5%~107.3%之间,实现了对食品中盐酸克伦特罗残留的现场、低成本、快速、准确地检测。本实验研制的微流控芯片及平台优点包括:(1)可在平台上自动进样、生化反应,最大程度地减少人为因素的影响;(2)芯片材料采用常见的PMMA和PS,价格

低且易于大批量生产,适合食品中盐酸克伦特罗残留的检测需求;(3)系统配置恒温功能,避免环境温度的影响;(4)反应体系与外界环境无接触,防止交叉污染;(5)微流体操控技术能够进一步提高反应的均一性和检测的准确性。因此,本文提出的微流控芯片及平台具有操作简易、检测精度高、重复性与准确性好的优势,有望满足食品中CL残留的现场快速检测的需求。

#### 参考文献:

- [1] 周群标,桑压新,王丽,等.动物性食品中盐酸克伦特罗ELISA检测方法的建立及应用[J].中国食品学报,2011,11(6):158-162
- [2] 冯敬敬.盐酸克伦特罗ELISA检测方法的建立及其纳米抗体的筛选[D].天津:天津大学,2012:34-35
- [3] 王秋平,哈婧,刘硕,等.盐酸克伦特罗检测方法的研究进展[J].河北工业科技,2013,30(2):125-129
- [4] 何红梅,张春荣,李锐,等.酶联免疫法测定猪肉、猪肝和猪尿中盐酸克伦特罗[J].理化检验,2012,48(1):40-42
- [5] 王岭,田世民,高海霞,等.玉米细菌性枯萎病改良Dot-ELISA检测研究[J].微生物学通报,2008,35(2):230-234
- [6] 梁臻龙,王策,李炯,等.基于微流控技术与酶促化学发光免疫技术检测血清CEA方法的建立及初步应用评价[J].临床检验杂志,2015,33(12):892-894
- [7] 徐温,吕君江,范伟,等.微流控分析芯片上生化反应技术研究进展[J].化学进展,2007,19(5):820-831
- [8] 苏文涛,冯可,秦建华,等.微流控芯片在心肌标志物检测中的研究进展[J].分析化学,2015,43(10):1490-1498
- [9] 董艳丽,翟海云,刘翠,等.微流控芯片非接触电导检测法快速测定盐酸克林霉素的含量[J].分析测量学报,2015,35(7):893-896
- [10] 范宝龙,王晓东,杨平,等.用于农药残留现场快速检测的微流控芯片研制[J].食品科学,2016,37(2):198-203
- [11] 萧金仪,曹家健,卢殿贤,等.双相层流微流控芯片快速提取人参皂苷[J].中药材,2015,38(5):1070-1072
- [12] 张凤莲,米静.微流控芯片热压键合设备的结构设计[J].微细加工技术,2006,(3):58-61
- [13] 李利花,陈攀光,蔡自由.微流控芯片非接触电导检测分析法测定僵蚕中草酸铵[J].化学试剂,37(4):331-334
- [14] 栗云霞,李楠,平华,等.基于酶抑制法的农药残留快速检测仪器现状及评价[J].食品安全质量检测学报,2012,6(3):690-694
- [15] 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):2591-2599