



# (12)发明专利

(10)授权公告号 CN 104459136 B

(45)授权公告日 2016.09.07

(21)申请号 201410725798.6

(51)Int.Cl.

(22)申请日 2014.12.03

G01N 33/577(2006.01)

G01N 33/532(2006.01)

(65)同一申请的已公布的文献号

申请公布号 CN 104459136 A

审查员 赵晓明

(43)申请公布日 2015.03.25

(73)专利权人 中国农业科学院农业质量标准与检测技术研究所

地址 100081 北京市海淀区中关村南大街12号

(72)发明人 王培龙 苏晓鸥 王日楠 石雷 吴晓春

(74)专利代理机构 北京纪凯知识产权代理有限公司 11245

代理人 关畅 陈晓庆

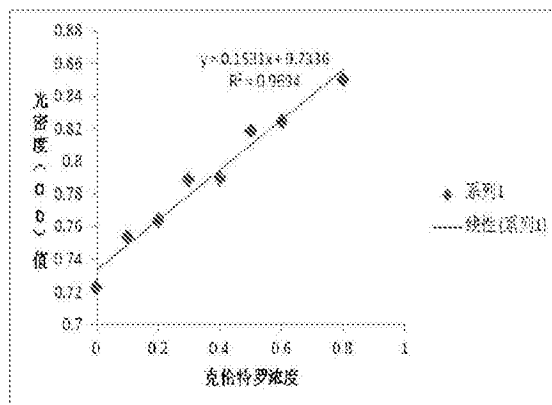
权利要求书2页 说明书5页 附图3页

## (54)发明名称

一种Au@Pt酶模拟物标记的盐酸克伦特罗ELISA检测试剂盒

## (57)摘要

本发明公开了一种Au@Pt酶模拟物标记的克伦特罗ELISA检测试剂盒。该试剂盒包括Au@Pt纳米颗粒标记的二抗。所述Au@Pt纳米颗粒标记的二抗按照如下方法制备得到：将浓度为6mg/ml的二抗按照1:1000的比例进行稀释，得到稀释后的二抗；将浓度为5nM的修饰后的Au@Pt纳米颗粒悬浮液按照1:4的比例进行稀释，得到稀释后的Au@Pt纳米颗粒悬浮液。将所述稀释后的二抗与稀释后的Au@Pt纳米颗粒悬浮液按照体积比为4:100进行混合，在4℃下反应4天，得到所述Au@Pt纳米颗粒标记的二抗。实验结果表明：本发明的Au@Pt酶模拟物标记的克伦特罗ELISA检测试剂盒具有操作简单，反应时间短，灵敏度高、成本低等特点。



1. 一种检测待测样品中盐酸克伦特罗浓度的方法,包括如下步骤:

(1)将盐酸克伦特罗单抗包被到酶标板上,待用;

(2)向包被盐酸克伦特罗单抗的酶标板中加入盐酸克伦特罗标准溶液或待测样品,反应;

(3)加入Au@Pt纳米颗粒标记的二抗,反应;

(4)加入底物显色,显色后各孔终止反应;

(5)用酶标仪检测加入标准溶液的各孔的吸光度值,以盐酸克伦特罗标准溶液浓度为横坐标、以酶标仪的读数为纵坐标绘制标准曲线;

(6)用酶标仪检测加入待测样品的孔的吸光度值,将吸光度值代入所述标准曲线,即得待测样品中盐酸克伦特罗的浓度;

所述Au@Pt纳米颗粒标记的二抗的获得方法包括如下步骤:

A、将Au@Pt纳米颗粒制成Au@Pt纳米颗粒悬浮液;

B、将Au@Pt纳米颗粒悬浮液离心,得到Au@Pt纳米颗粒沉淀物;

C、将Au@Pt纳米颗粒沉淀物用水复溶,并加入聚苯乙烯磺酸钠,反应;

D、反应后离心,倒掉上清液分离出沉淀物,将沉淀物用水溶解,得到修饰后的Au@Pt纳米颗粒悬浮液;

E、将二抗加入所述修饰后的Au@Pt纳米颗粒悬浮液中,反应,得到所述的Au@Pt纳米颗粒标记的二抗;

所述将二抗加入所述修饰后的Au@Pt纳米颗粒悬浮液前,还需将二抗和修饰后的Au@Pt纳米颗粒悬浮液进行稀释的步骤;

所述将二抗进行稀释的方法:将浓度为6mg/ml的二抗按照1:1000的比例进行稀释,得到稀释后的二抗;

所述将修饰后的Au@Pt纳米颗粒悬浮液进行稀释的方法:将浓度为5nM的修饰后的Au@Pt纳米颗粒悬浮液按照1:4的比例进行稀释,得到稀释后的Au@Pt纳米颗粒悬浮液;

所述将二抗加入所述修饰后的Au@Pt纳米颗粒悬浮液中的方法:将所述稀释后的二抗与稀释后的Au@Pt纳米颗粒悬浮液混合,所述稀释后的二抗与所述稀释后的Au@Pt纳米颗粒悬浮液的体积比为4:100;

所述步骤E中反应条件是:在4℃下反应4天。

2. 根据权利要求1所述的方法,其特征在于:所述底物为四甲基联苯胺;

所述显色后各孔加入50μL的浓度为4M的硫酸溶液终止反应。

3. 根据权利要求1或2所述的方法,其特征在于:用酶标仪检测吸光度值时的波长为450nm。

4. 一种酶联免疫试剂盒,包括Au@Pt纳米颗粒标记的二抗;

所述Au@Pt纳米颗粒标记的二抗按照如下方法制备得到:

A、将Au@Pt纳米颗粒制成Au@Pt纳米颗粒悬浮液;

B、将Au@Pt纳米颗粒悬浮液离心,得到Au@Pt纳米颗粒沉淀物;

C、将Au@Pt纳米颗粒沉淀物用水复溶,并加入聚苯乙烯磺酸酯,反应;

D、反应后离心,倒掉上清液分离出沉淀物,将沉淀物用水溶解,得到修饰后的Au@Pt纳米颗粒悬浮液;

E、将二抗加入所述修饰后的Au@Pt纳米颗粒悬浮液中,反应,得到所述的Au@Pt纳米颗粒标记的二抗;

所述将二抗加入所述修饰后的Au@Pt纳米颗粒悬浮液前,还需将二抗和修饰后的Au@Pt纳米颗粒悬浮液进行稀释的步骤;

所述将二抗进行稀释的方法:将浓度为6mg/ml的二抗按照1:1000的比例进行稀释,得到稀释后的二抗;

所述将修饰后的Au@Pt纳米颗粒悬浮液进行稀释的方法:将浓度为5nM的修饰后的Au@Pt纳米颗粒悬浮液按照1:4的比例进行稀释,得到稀释后的Au@Pt纳米颗粒悬浮液;

所述将二抗加入所述修饰后的Au@Pt纳米颗粒悬浮液中的方法:将所述稀释后的二抗与稀释后的Au@Pt纳米颗粒悬浮液混合,所述稀释后的二抗与所述稀释后的Au@Pt纳米颗粒悬浮液的体积比为4:100;

所述步骤E中反应条件是:在4℃下反应4天。

5. 权利要求4所述的试剂盒在检测待测样品中盐酸克伦特罗浓度中的应用。

6. 权利要求4所述的试剂盒在辅助检测待测样品中盐酸克伦特罗浓度中的应用。

## 一种Au@Pt酶模拟物标记的盐酸克伦特罗ELISA检测试剂盒

### 技术领域

[0001] 本发明属于生物技术领域,具体涉及一种Au@Pt酶模拟物标记的盐酸克伦特罗ELISA检测试剂盒。

### 背景技术

[0002] 盐酸克伦特罗是一种人工合成用于治疗哮喘的药物,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。但长期使用该药物会在动物可食性组织中残留,人食用后会引起中毒,因此我国和欧盟均禁止应用盐酸克伦特罗作促生长剂。然而受经济利益的驱使,许多不法企业和生产商依然进行非法添加,这给人民的身体健康和生命安全造成潜在的危害。因此,有必要建立快速、灵敏、有效和廉价的检测技术和方法。

[0003] 目前,对于盐酸克伦特罗的检测技术包括快速筛选法和仪器确证法。其中,快速筛选主要以胶体金试纸条和酶联免疫试剂盒(ELISA)为主。胶体金试纸条灵敏度明显偏低,常规ELISA试剂盒中酶的活性受温度影响较大,且价格较高。仪器确证法包括气相色谱质谱联用法(GC-MS)、高效液相色谱法(HPLC)和液相色谱-质谱联用法(LC-MS)等。仪器确证技术虽然测定准确、回收率高、特异性好,但样品基质复杂,前处理的过程耗时长,对样品的灵敏度和准确度影响较大并且最终检测所需设备昂贵,使得基层单位和企业难以实现现场快速检测。

### 发明内容

[0004] 本发明的一个目的是提供一种检测待测样品中盐酸克伦特罗浓度的方法。

[0005] 本发明提供的检测待测样品中盐酸克伦特罗浓度的方法包括如下步骤:

[0006] (1)将盐酸克伦特罗单抗包被到酶标板上,待用;

[0007] (2)向包被盐酸克伦特罗单抗的酶标板中加入盐酸克伦特罗标准溶液或待测样品,反应;

[0008] (3)加入Au@Pt纳米颗粒标记的二抗,反应;

[0009] (4)加入底物显色,显色后各孔终止反应;

[0010] (5)用酶标仪检测加入标准品的各孔的吸光度值,以盐酸克伦特罗标准溶液浓度为横坐标、以酶标仪的读数为纵坐标绘制标准曲线;

[0011] (6)用酶标仪检测加入待测样品的孔的吸光度值,将吸光度值代入所述标准曲线,即得待测样品中盐酸克伦特罗的浓度。

[0012] 上述方法中,所述Au@Pt纳米颗粒标记的二抗的获得方法包括如下步骤:

[0013] A、将Au@Pt纳米颗粒制成Au@Pt纳米颗粒悬浮液;

[0014] B、将Au@Pt纳米颗粒悬浮液离心,得到Au@Pt纳米颗粒沉淀物;

[0015] C、向Au@Pt纳米颗粒的水悬液中加入聚苯乙烯磺酸钠,反应;

[0016] D、反应后离心,倒掉上清液分离出沉淀物,将沉淀物用水溶解,得到修饰后的Au@

Pt纳米颗粒悬浮液；

[0017] E、将二抗加入所述修饰后的Au@Pt纳米颗粒悬浮液中，反应，得到所述的Au@Pt纳米颗粒标记的二抗。

[0018] 上述方法中，所述将二抗加入所述修饰后的Au@Pt纳米颗粒悬浮液前，还需将二抗和修饰后的Au@Pt纳米颗粒悬浮液进行稀释的步骤；

[0019] 所述将二抗进行稀释的方法：将浓度为6mg/ml的二抗按照1:1000的比例进行稀释，得到稀释后的二抗；

[0020] 所述将修饰后的Au@Pt纳米颗粒悬浮液进行稀释的方法：将浓度为5nM的修饰后的Au@Pt纳米颗粒悬浮液按照1:4的比例进行稀释，得到稀释后的Au@Pt纳米颗粒悬浮液。

[0021] 上述方法中，所述将二抗加入所述修饰后的Au@Pt纳米颗粒悬浮液中的方法：将所述稀释后的二抗与稀释后的Au@Pt纳米颗粒悬浮液混合，所述稀释后的二抗与所述稀释后的Au@Pt纳米颗粒悬浮液的体积比为4:100。

[0022] 上述方法中，所述步骤E中反应条件是：在4℃下反应4天。

[0023] 上述方法中，所述底物为四甲基联苯胺。

[0024] 上述方法中，所述显色后各孔加入50μL的浓度为4M的硫酸溶液终止反应。

[0025] 上述方法中，所述用酶标仪检测吸光度值时的波长为450nm。

[0026] 本发明的另一个目的是提供Au@Pt纳米颗粒在作为酶联免疫检测中使用的标记中的应用。

[0027] 本发明的最后一个目的是提供一种酶联免疫试剂盒。

[0028] 本发明提供的酶联免疫试剂盒包括Au@Pt纳米颗粒标记的二抗。

[0029] 上述试剂盒中，所述Au@Pt纳米颗粒标记的二抗按照如下方法制备得到：

[0030] A、将Au@Pt纳米颗粒制成Au@Pt纳米颗粒悬浮液；

[0031] B、将Au@Pt纳米颗粒悬浮液离心，得到Au@Pt纳米颗粒沉淀物；

[0032] C、向Au@Pt纳米颗粒的水悬液中加入聚苯乙烯磺酸酯，反应；

[0033] D、反应后离心，倒掉上清液分离出沉淀物，将沉淀物用水溶解，得到修饰后的Au@Pt纳米颗粒悬浮液；

[0034] E、将二抗加入所述修饰后的Au@Pt纳米颗粒悬浮液中，反应，得到所述的Au@Pt纳米颗粒标记的二抗。

[0035] 上述所述的试剂盒在检测或辅助检测待测样品中盐酸克伦特罗浓度中的应用也是本发明的保护范围。

[0036] Au@Pt纳米材料具有成本低、制备简单、稳定性更好，生物活性好等优点，并且纳米粒子因其比表面积大，表面活化中心多，催化活性和催化效率也大大增强。与天然辣根过氧化物酶(HRP)相比具有可调的催化活性，其不仅具有天然酶的优点同时也克服了天然酶的缺点，这使它成为一个有前途的酶模拟物。本发明采用该纳米结构材料-Au@Pt替代天然辣根过氧化物酶，研发了基于Au@Pt纳米材料标记二抗的ELISA检测盐酸克伦特罗的试剂盒。本试剂盒具有操作简单，反应时间短，灵敏度高、成本低等特点，能够很好的用于盐酸克伦特罗的检测。

## 附图说明

- [0037] 图1为二抗与Au@Pt纳米材料偶联时间比较。
- [0038] 图2为盐酸克伦特罗在不同浓度范围的线性相关性。
- [0039] 图3为盐酸克伦特罗灵敏度曲线。

### 具体实施方式

- [0040] 下述实施例中所使用的实验方法如无特殊说明,均为常规方法。
- [0041] 下述实施例中所用的材料、试剂等,如无特殊说明,均可从商业途径得到。
- [0042] 实施例1、试剂盒及使用方法
- [0043] 一、Au@Pt纳米颗粒标记的二抗
- [0044] 1、Au@Pt纳米颗粒悬浮液的制备及修饰
- [0045] (1)纳米金棒溶液的制备
- [0046] 将7.5ml溴化十六烷基三甲铵CTAB(0.1M)水溶液与100 $\mu$ l的HAuCl<sub>4</sub>溶液(24mM)混合,并用超纯水稀释至9.4ml;然后在磁子搅拌的条件下加入0.6ml的NaBH<sub>4</sub>溶液(0.01M);搅拌3min后停止,在室温下静置反应30min,得到纳米金种子溶液(合成后的纳米金种子要在2-5h以内进行使用)。
- [0047] 将240 $\mu$ l的纳米金种子溶液加入到生长溶液(由100ml的0.1M CTAB溶液、2.04ml的0.024M HAuCl<sub>4</sub>溶液、2ml的0.5M H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>溶液、1ml的10mM AgNO<sub>3</sub>溶液和800ml的0.1M左旋维生素C溶液组成)中开始生长。生长12h后,在离心机上以12,000rpm速度离心5min获得纳米金棒,离心两次,收集沉淀并再次分散于100ml去离子水中,得到纳米金棒溶液。
- [0048] (2)Au@Pt纳米颗粒悬浮液的制备
- [0049] 将1ml纳米金棒溶液稀释至2ml,加入120 $\mu$ l的PtCl<sub>4</sub><sup>2-</sup>溶液(2mM),然后按照一定比例加入到0.1M的左旋维生素C溶液中(左旋维生素C溶液与PtCl<sub>4</sub><sup>2-</sup>溶液的体积比为10:1)。混合溶液在30℃中剧烈震荡30min,颜色由粉红色变为黑灰色,得到Au@Pt纳米颗粒悬浮液,为防止纳米颗粒聚集,加入1ml的CTAB溶液(0.1M)阻止反应继续进行。
- [0050] (3)Au@Pt纳米颗粒悬浮液的修饰
- [0051] A、将1mL的Au@Pt纳米颗粒悬浮液离心(10000rpm,5min),倒掉上清液分离出Au@Pt纳米颗粒沉淀物;
- [0052] B、将Au@Pt纳米颗粒沉淀物用1ml水复溶,并加入50ml的20mg/ml的聚苯乙烯磺酸钠(PSS,含60mM NaCl);
- [0053] C、将上述混合液在30℃水浴中反应3h;
- [0054] D、反应后离心(10000rpm,5min),倒掉上清液分离出沉淀物,沉淀物用1ml水溶解,得到修饰后的Au@Pt纳米颗粒悬浮液。
- [0055] 2、Au@Pt纳米颗粒标记的二抗的获得
- [0056] 用磷酸缓冲稀释液(0.01M,pH 7.4)将上述修饰后的浓度为5nM的Au@Pt纳米颗粒悬浮液稀释4倍,得到浓度为1.25nM的Au@Pt纳米颗粒悬浮液;将浓度为6mg/ml的二抗(北京勤邦生物技术有限公司提供)稀释1000倍,得到浓度为6 $\mu$ g/ml的二抗;将40 $\mu$ l的浓度为6 $\mu$ g/ml的二抗与1ml的浓度为1.25nM的Au@Pt纳米颗粒悬浮液混合,在4℃下反应4天,得到Au@Pt纳米颗粒标记的二抗。
- [0057] 二、Au@Pt酶模拟物标记的克伦特罗ELISA检测试剂盒的使用方法

[0058] (1)将盐酸克伦特罗单克隆抗体(15mg/ml)稀释3000倍,每孔中加入100u1碳酸钠缓冲液(0.05M,pH 9.0)作为包被液。通过物理吸附包被到聚乙烯酶标板上,干燥后待用。

[0059] (2)向包被克伦特罗单抗的酶标板中分别加入100u1的不同梯度(0ppb、0.1ppb、0.3ppb、0.9ppb、2.7ppb和8.1ppb)的克伦特罗标准溶液或待测样品,在37℃恒温箱下反应30min,用200u1洗涤液洗板4次,用吸水纸拍干板内洗液。

[0060] (3)加入上述获得的Au@Pt纳米颗粒标记的二抗,室温反应15min,用200u1洗涤液(含0.05%吐温20磷酸缓冲盐水)洗板3次,用吸水纸拍干板内洗液。

[0061] (4)加入底物四甲基联苯胺(TMB)显色,显色后每孔加入50uL的终止液(4M的硫酸水溶液)终止反应。

[0062] (5)用酶标仪上(450nm)进行检测,读取加入标准品的各孔的吸光度值,并以酶标仪的读数为纵坐标、以标准品的浓度为横坐标绘制标准曲线;

[0063] (6)用酶标仪上(450nm)进行检测,读取加入待测样品的孔的吸光度值,并代入标准曲线;从曲线上可读出待测样品中盐酸克伦特罗的浓度。

[0064] 实施例2、二抗与Au@Pt纳米材料的偶联比和偶联时间的优化

[0065] 一、二抗与Au@Pt纳米材料偶联比的优化

[0066] 将40u1的6mg/ml的二抗按1:1000、1:2000、1:4000、1:8000、1:10000不同比例进行稀释后加入到1ml的1.25nM的Au@Pt纳米颗粒悬浮液中,4℃的冰箱下孵化4天后,按照实施例1中的使用方法进行检测其灵敏度和线性相关性,结果如表1所示。结果表明:在稀释比例为1:1000时,不同浓度的克伦特罗线性关系良好,且其灵敏度达到0.1ng/ml。

[0067] 表1、二抗与Au@Pt纳米材料偶联比

[0068]

标准品 浓度 二抗 稀释倍数	0 ng/ml	0.1 ng/ml	0.2 ng/ml	0.3 ng/ml	0.4 ng/ml	0.5 ng/ml	0.6 ng/ml	0.8 ng/ml
1:1000	1.075	1.100	1.105	1.127	1.145	1.175	1.239	1.240
1:2000	1.287	1.290	1.371	1.387	1.414	1.313	1.264	1.364
1:4000	1.747	1.578	1.621	1.795	1.731	1.752	1.902	1.809
1:8000	1.639	1.529	1.579	1.578	1.484	1.418	1.504	1.528
1:10000	0.876	0.843	0.839	0.843	0.825	0.807	0.798	0.857

[0069] 二、二抗与Au@Pt纳米材料偶联时间优化

[0070] 在4℃下,比较了孵化1天和4天的效果,结果如图1所示。结果表明:孵化时间为4天较1天的R<sup>2</sup>相对低点,但是4天的响应值较高,经过4天孵化后,二抗与Au@Pt纳米材料能够较好结合,即使是在较低温度(15℃)下,显色反应15min就能达到较好的显色效果。因此,二抗与Au@Pt纳米材料偶联时间为4天。

[0071] 实施例3、Au@Pt酶模拟物标记的盐酸克伦特罗ELISA检测试剂盒性能

[0072] 按照实施1中的Au@Pt酶模拟物标记的克伦特罗ELISA检测试剂盒的使用方法对Au@Pt酶模拟物标记的盐酸克伦特罗ELISA检测试剂盒的线性范围、线性相关系数和检测灵敏度方面进行检测。该试剂盒中二抗与Au@Pt纳米材料偶联体积比为4:100,偶联时间为4天。

[0073] 结果表明:盐酸克伦特罗浓度在0-100ng/ml范围内,盐酸克伦特罗的浓度与OD值是呈曲线型相关性。当浓度超过10ng/ml后,盐酸克伦特罗与酶标板上单抗达到饱和状态,

其OD值变化不大(见图2A)。盐酸克伦特罗在0ng/ml-5ng/ml范围内,其浓度与OD值呈现出较好的线性关系,其 $R^2$ 为0.970(见图2B)。盐酸克伦特罗在0ng/ml-1ng/ml之间,其线性关系良好, $R^2$ 为0.969,其检测灵敏度达到0.1ng/ml(见图3)。以上结果说明Au@Pt酶模拟物标记的盐酸克伦特罗ELISA检测试剂盒能够很好的用于盐酸克伦特罗的检测。

[0074] 实施例4、用Au@Pt酶模拟物标记的盐酸克伦特罗ELISA检测试剂盒对尿样的检测

[0075] 向空白尿样中加入不同浓度梯度的盐酸克伦特罗(CL),用稀盐酸调节样品pH值,使其保持在pH为4.5左右。用Au@Pt酶模拟物标记的盐酸克伦特罗ELISA检测试剂盒进行检测。结果表明:空白尿样中均未检测出CL,添加盐酸克伦特罗的尿样检测回收率达到77.4%以上,相对标准偏差低于15%。

[0076] 表2、尿样的检测结果

猪尿	未添加CL检测 (ng/ml)	添加CL (ng/ml)	检测结果 (ng/ml)	回收率 (%)	相对标准偏差 (%)
[0077] A	0	0.1	0.077445	77.4	12.7
B	0	0.3	0.285326	95.1	7.6
C	0	0.5	0.471467	94.3	5.9

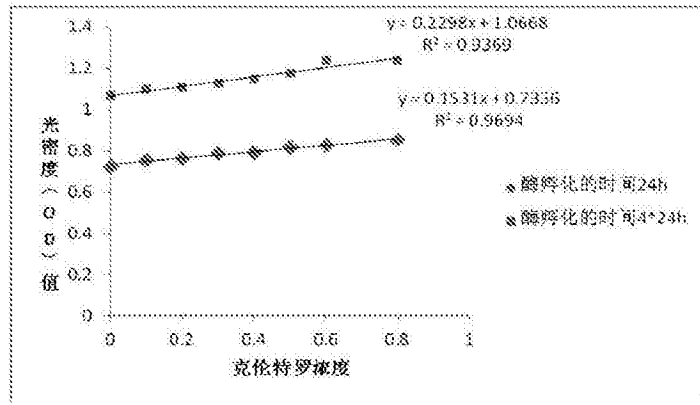
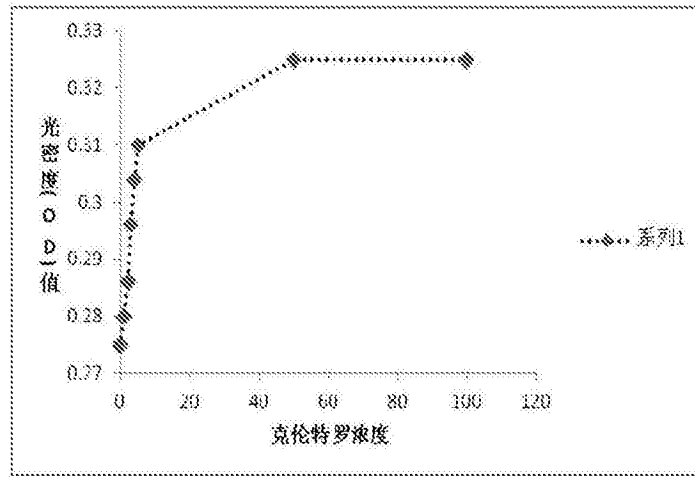
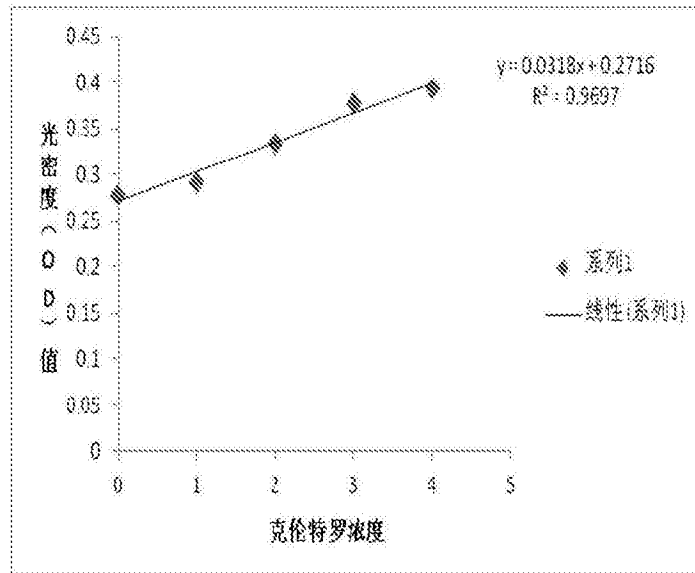


图1



A



B

图2

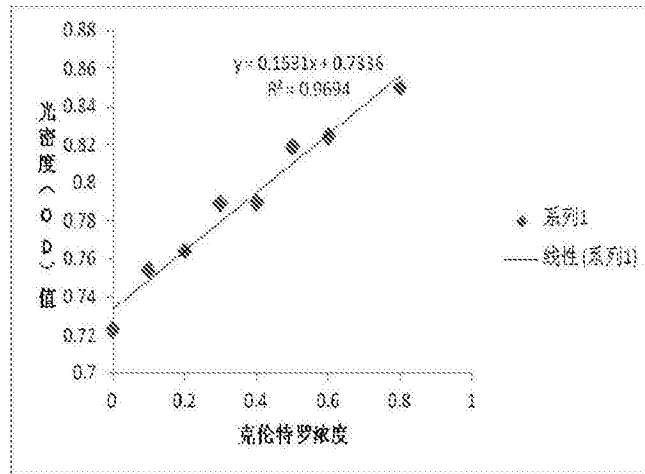


图3

专利名称(译)	一种Au@Pt酶模拟物标记的盐酸克伦特罗ELISA检测试剂盒		
公开(公告)号	<a href="#">CN104459136B</a>	公开(公告)日	2016-09-07
申请号	CN201410725798.6	申请日	2014-12-03
[标]申请(专利权)人(译)	中国农业科学院农业质量标准与检测技术研究所		
申请(专利权)人(译)	中国农业科学院农业质量标准与检测技术研究所		
当前申请(专利权)人(译)	中国农业科学院农业质量标准与检测技术研究所		
[标]发明人	王培龙 苏晓鸥 王日楠 石雷 吴晓春		
发明人	王培龙 苏晓鸥 王日楠 石雷 吴晓春		
IPC分类号	G01N33/577 G01N33/532		
CPC分类号	G01N33/532 G01N33/577		
代理人(译)	关畅 陈晓庆		
审查员(译)	赵晓明		
其他公开文献	CN104459136A		
外部链接	<a href="#">Espacenet</a> <a href="#">SIPO</a>		

摘要(译)

本发明公开了一种Au@Pt酶模拟物标记的克伦特罗ELISA检测试剂盒。该试剂盒包括Au@Pt纳米颗粒标记的二抗。所述Au@Pt纳米颗粒标记的二抗按照如下方法制备得到：将浓度为6mg/ml的二抗按照1:1000的比例进行稀释，得到稀释后的二抗；将浓度为5nM的修饰后的Au@Pt纳米颗粒悬浮液按照1:4的比例进行稀释，得到稀释后的Au@Pt纳米颗粒悬浮液。将所述稀释后的二抗与稀释后的Au@Pt纳米颗粒悬浮液按照体积比为4:100进行混合，在4°C下反应4天，得到所述Au@Pt纳米颗粒标记的二抗。实验结果表明：本发明的Au@Pt酶模拟物标记的克伦特罗ELISA检测试剂盒具有操作简单，反应时间短，灵敏度高、成本低等特点。

