



(12) 发明专利申请

(10) 申请公布号 CN 104914249 A

(43) 申请公布日 2015. 09. 16

(21) 申请号 201510396691. 6

C07K 16/16(2006. 01)

(22) 申请日 2015. 07. 08

C07K 16/06(2006. 01)

(71) 申请人 河南省农业科学院

地址 450002 河南省郑州市金水区花园路
116 号

(72) 发明人 邓瑞广 胡晓飞 王耀 李青梅
王方雨 杨继飞 郝天红

(74) 专利代理机构 郑州市华翔专利代理事务所
(普通合伙) 41122

代理人 张爱军

(51) Int. Cl.

G01N 33/68(2006. 01)

G01N 33/558(2006. 01)

G01N 33/577(2006. 01)

G01N 33/532(2006. 01)

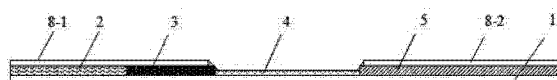
权利要求书3页 说明书6页 附图1页

(54) 发明名称

快速检测大豆 Kunitz 胰蛋白酶抑制因子的
胶体金免疫层析试纸及制备方法

(57) 摘要

本发明涉及一种快速检测大豆 Kunitz 胰蛋白酶抑制因子的胶体金免疫层析试纸及制备方法,该试纸基于双抗体夹心的原理检测 KTI,试纸含有支撑层、吸附层、保护层,吸附层从测试端依次为样品垫、结合垫、纤维素膜和吸水垫。结合垫吸附有 KTI 的特异性抗体,纤维素膜设有用 KTI 兔源多克隆抗体溶液喷点的检测线以及用羊抗小鼠 IgG 抗体或兔抗小鼠 IgG 抗体溶液喷点的质控线,KTI 的特异性抗体采用胶体金纳米颗粒标记的 KTI 鼠源单克隆抗体。本发明的免疫层析试纸特异性强、灵敏度高,检测简便、直观、准确,成本低,适用范围广,易于推广应用。



1. 一种快速检测 KTI 的胶体金免疫层析试纸, 底层为支撑层, 中间层为吸附层, 保护层固定在吸附层上, 吸附层从测试端依次为样品垫、结合垫、纤维素膜和吸水垫, 特征在于: 在纤维素膜设有用 KTI 兔源多克隆抗体溶液喷点的隐形检测线以及用羊抗小鼠 IgG 抗体或兔抗小鼠 IgG 抗体溶液喷点的隐形质控线; 所述结合垫吸附有胶体金纳米颗粒标记的 KTI 鼠源单克隆抗体。

2. 根据权利要求 1 所述的免疫层析试纸, 其特征是: 所述支撑层用不吸水的韧性材料制成; 样品垫用玻璃纤维棉、尼龙膜、聚偏二氟乙烯膜或聚酯膜制成; 结合垫用玻璃纤维棉、聚酯膜、醋酸纤维或尼龙膜制成; 纤维素膜用硝酸纤维素膜、纯纤维素膜或羧化纤维素膜制成; 吸水垫用吸水滤纸或滤油纸制成。

3. 根据权利要求 1 所述的免疫层析试纸, 其特征是: 所述隐形检测线和隐形质控线为平行排列的“||”直线式印迹; 在所述样品垫、结合垫及吸水垫上覆盖有保护层, 在样品垫与结合垫交界处对应的保护层上喷点有样品标记线。

4. 根据权利要求 1 所述的免疫层析试纸, 其特征是: 其中 KTI 兔源多克隆抗体的制备方法如下:

取清洁级 3 月龄新西兰大白兔, 用 KTI 溶液进行免疫, 颈部皮下分 4~6 点注射, 首次免疫剂量为 200 μ g/ 只, 用无菌 PBS 稀释 KTI 与等量弗氏完全佐剂混合, 25000r/min 充分乳化 10min; 加强免疫剂量增大, 为 300 μ g/ 只, 免疫 4 次, 用无菌 PBS 稀释 KTI 与等量弗氏不完全佐剂混合, 25000r/min 充分乳化 10min, 共免疫 4 次, 每次免疫间隔 3 周, 最后一次免疫 30 天后以 ELISA 法测定效价, 并鉴定其敏感性和特异性, 心脏采血并分离收集血清; 以饱和硫酸铵盐析法纯化兔源多克隆抗体, 即取 1 份血清加 2 份 pH7.2 的 PBS, 混匀, 加等体积饱和硫酸铵溶液混匀, 置 4 $^{\circ}$ C 冰箱 12h, 4 $^{\circ}$ C、10000rpm 离心 30min, 弃上清, 再以适量 pH7.2 的 PBS 溶解沉淀, 加饱和硫酸铵溶液至终浓度为 33%, 置 4 $^{\circ}$ C 冰箱 12h, 4 $^{\circ}$ C、10000rpm 离心 30min, 弃上清, 以适量 pH7.2 的 PBS 溶解沉淀, 置 4 $^{\circ}$ C 冰箱内用 pH7.2 的 PBS 透析 48~72h, 中间换液 6~8 次, 4 $^{\circ}$ C、12000rpm 离心 15min, 收集上清, 得初步纯化的 KTI 兔源多克隆抗体;

然后采用 Protein G 亲和层析柱进一步纯化, 先用 10 倍柱体积的 PBS 起始缓冲液平衡层析柱, 将初步纯化的 KTI 兔源多克隆抗体用起始缓冲液 1:1 稀释后, 通过 0.22 μ m 的一次性无菌过滤器过滤后加样, 随后用 10 倍柱体积的起始缓冲液流洗, 除去未结合的抗体, 最后用 2 倍柱体积的洗脱缓冲液洗脱, 用盛有中和液的离心管收集, 再用 PBS 充分透析, 备用; 所述洗脱缓冲液为 0.1mol/L 的甘氨酸 - 盐酸, pH 值为 2.5; 中和液为 0.1mol/L 的 Tris-HCl、pH 值为 9.0。

5. 根据权利要求 1 所述的免疫层析试纸, 其特征是: 其中 KTI 鼠源单克隆抗体的制备方法如下:

取 SPF 级 6~8 周龄 BALB/c 小鼠, 用 KTI 溶液进行免疫, 剂量为 50 μ g/ 只, 背部皮下分 4~6 点注射, 免疫 4 次, 首次免疫用无菌 PBS 稀释 KTI, 与等量 FCA 混合, 加强免疫用无菌 PBS 稀释 KTI 与等量 FIA 混合, 25000r/min 充分乳化 10min, 免疫间隔 3 周, 确定抗体效价符合要求后, 以 50 μ g/ 只的剂量不加佐剂进行超强免疫, 之后 3~4 天将免疫小鼠眶下窦采血, 分离阳性血清; 脱颈致死, 用体积比为 75% 的酒精浸泡小鼠 5~10min 消毒体表, 无菌操作取其脾脏, 将脾脏剪碎并研磨, 经 120 目尼龙纱布过滤, 1000rpm 离心 10min, 收集脾细胞, 将 1×10^8 的脾细胞与 NS0 骨髓瘤细胞按 10:1 的比例混合, 1000rpm 离心 10min, 弃上清, 细胞沉淀物

于 37℃ 水浴中缓慢加入 0.7~1.0mL 的 PEG1500 作用 1min, 然后缓慢加入无血清 1640 培养基 15mL, 以终止 PEG 的作用; 37℃ 水浴 5~10 min, 1000rpm 离心 10min 弃上清, 将细胞沉淀物重悬于 HAT 选择培养基中, 并加入 96 孔细胞培养板, 100μL~200μL/ 孔, 置于 37℃、5% 的 CO₂ 培养箱中培养; 培养 10~14 天, 用间接 ELISA 和间接竞争 ELISA 法进行阳性孔筛选, 将选择的孔进行 2~3 次有限稀释克隆化, 阳性孔扩大培养后建立杂交瘤细胞株; 采用小鼠体内诱生腹水法获得腹水, 再经纯化得到鼠源单克隆抗体。

6. 根据权利要求 1-5 任一项所述的免疫层析试纸, 其特征是: 其中胶体金纳米颗粒标记的 KTI 鼠源单克隆抗体的制备方法如下:

在沸腾的 0.01~0.02% 的氯金酸溶液中加入 1% 的新配制柠檬酸钠溶液, 获得直径 15~20nm 的胶体金溶液, 用 0.1mol/L 的 K₂CO₃ 调节 pH 值至 8.5~9.5, 置 2~8℃ 保存备用; 以 1:2000 的标记比将待标记的 KTI 鼠源单克隆抗体加入 pH 8.5~9.5 的胶体金溶液中, 标记 30min 后, 加入 10% 的 BSA, 静置 30min, 4℃、13000rpm 离心 30min 弃上清; 沉淀用含 2% BSA 的 0.02mol/L 四硼酸钠溶液复溶, 4℃、13000rpm 离心 30min 弃上清; 将胶体金纳米颗粒沉淀用 25 mL 的 TB 重悬液重悬, 获得胶体金标记的 KTI 鼠源单克隆抗体; 其中 TB 重悬液为 0.02 mol/L 的四硼酸钠溶液, 其中含重量比为 1% 的 BSA 和 0.03% 的叠氮钠。

7. 权利要求 1 所述的免疫层析试纸的制备方法, 其特征是: 该方法包括以下步骤:

首先制备 KTI 兔源多克隆抗体, 然后制备 KTI 鼠源单克隆抗体, 并用胶体金纳米颗粒进行标记, 用胶体金纳米颗粒标记的 KTI 鼠源单克隆抗体制备结合垫, 用 KTI 兔源多克隆抗体溶液喷点隐形检测线, 用羊抗小鼠 IgG 抗体或兔抗小鼠 IgG 抗体溶液喷点隐形质控线, 然后在支撑层上依次层叠黏贴样品垫、结合垫、纤维素膜和吸水垫, 最后加上保护层, 制得免疫层析试纸。

8. 如权利要求 7 所述的免疫层析试纸的制备方法, 其特征是: 其中 KTI 兔源多克隆抗体的制备方法如下:

取清洁级 3 月龄新西兰大白兔, 用 KTI 溶液进行免疫, 颈部皮下分 4~6 点注射, 首次免疫剂量为 200μg/ 只, 用无菌 PBS 稀释 KTI 与等量弗氏完全佐剂混合, 25000r/min 充分乳化 10min; 加强免疫剂量增大至 300μg/ 只, 免疫 4 次, 用无菌 PBS 稀释 KTI, 与等量弗氏不完全佐剂混合, 25000r/min 充分乳化 10min, 共免疫 4 次, 每次免疫间隔 3 周, 最后一次免疫 30 天后以 ELISA 法测定效价, 并鉴定其敏感性和特异性, 心脏采血并分离收集血清; 以饱和硫酸铵盐析法纯化兔源多克隆抗体, 即取 1 份血清加 2 份 pH7.2 的 PBS, 混匀, 加等体积饱和硫酸铵溶液混匀, 置 4℃ 冰箱 12h, 4℃、10000rpm 离心 30min, 弃上清, 再以适量 pH7.2 的 PBS 溶解沉淀, 加饱和硫酸铵溶液至终浓度为 33%, 置 4℃ 冰箱 12h, 4℃、10000rpm 离心 30min, 弃上清, 以适量 pH7.2 的 PBS 溶解沉淀, 置 4℃ 冰箱内用 pH7.2 的 PBS 透析 48~72h, 中间换液 6~8 次, 4℃、12000rpm 离心 15min, 收集上清, 得初步纯化的 KTI 兔源多克隆抗体;

然后采用 Protein G 亲和层析柱进一步纯化, 先用 10 倍柱体积的 PBS 起始缓冲液平衡层析柱, 将初步纯化的 KTI 兔源多克隆抗体用起始缓冲液 1:1 稀释后, 通过 0.22 μm 的一次性无菌过滤器过滤后加样, 随后用 10 倍柱体积的起始缓冲液流洗, 除去未结合抗体, 最后用 2 倍柱体积的洗脱缓冲液洗脱, 用盛有中和液的离心管收集, 再用 PBS 充分透析, 备用; 所述洗脱缓冲液为 0.1mol/L 的甘氨酸-盐酸, pH 值为 2.5; 中和液为 0.1mol/L 的 Tris-HCl, pH 值为 9.0。

9. 如权利要求 7 所述的免疫层析试纸的制备方法,其特征是:其中 KTI 鼠源单克隆抗体的制备方法如下:

取 SPF 级 6~8 周龄 BALB/c 小鼠,用 KTI 溶液进行免疫,剂量为 50 μ g/只,背部皮下分 4~6 点注射,免疫 4 次,首次免疫用无菌 PBS 稀释 KTI,与等量 FCA 混合,加强免疫用无菌 PBS 稀释 KTI,与等量 FIA 混合,25000r/min 充分乳化 10min,免疫间隔 3 周,确定抗体效价符合要求后,以 50 μ g/只的剂量不加佐剂进行超强免疫,之后 3~4 天将免疫小鼠眶下窦采血,分离阳性血清;脱颈致死,用体积比为 75% 的酒精浸泡小鼠 5~10min 消毒体表,无菌操作取其脾脏,将脾脏剪碎并研磨,经 120 目尼龙纱布过滤,1000rpm 离心 10min,收集脾细胞,将 1×10^8 的脾细胞与 NS0 骨髓瘤细胞按 10:1 的比例混合,1000rpm 离心 10min,弃上清,细胞沉淀物于 37 $^{\circ}$ C 水浴中缓慢加入 0.7~1.0mL 的 PEG1500 作用 1min,然后缓慢加入无血清 1640 培养基 15mL,以终止 PEG 的作用;37 $^{\circ}$ C 水浴 5~10 min,1000rpm 离心 10min 弃上清,将细胞沉淀物重悬于 HAT 选择培养基中,并加入 96 孔细胞培养板,100 μ L~200 μ L/孔,置于 37 $^{\circ}$ C、5% 的 CO₂培养箱中培养;培养 10~14 天,用间接 ELISA 和间接竞争 ELISA 法进行阳性孔筛选,将选择的孔进行 2~3 次有限稀释克隆化,阳性孔扩大培养后建立杂交瘤细胞株;采用小鼠体内诱生腹水法获得腹水,再经纯化得到鼠源单克隆抗体。

10. 如权利要求 7~9 任一项所述免疫层析试纸的制备方法,其特征是:其中胶体金纳米颗粒标记的 KTI 鼠源单克隆抗体的制备方法如下:

在沸腾的 0.01~0.02% 氯金酸溶液中加入 1% 的新配制柠檬酸钠溶液,获得直径 15~20nm 的胶体金溶液,用 0.1mol/L 的 K₂CO₃调节 pH 值至 8.5~9.5,置 2~8 $^{\circ}$ C 保存备用;以 1:2000 的标记比将待标记的 KTI 鼠源单克隆抗体加入 pH 8.5~9.5 的胶体金溶液中,标记 30min 后,加入 10% 的 BSA,静置 30min,4 $^{\circ}$ C、13000rpm 离心 30min,弃上清;沉淀用含 2% BSA 的 0.02mol/L 四硼酸钠溶液复溶,4 $^{\circ}$ C、13000rpm 离心 30min,弃上清;将胶体金纳米颗粒沉淀用 25 mL 的 TB 重悬液重悬,获得胶体金标记的 KTI 鼠源单克隆抗体;其中 TB 重悬液为 0.02 mol/L 的四硼酸钠溶液,其中含重量比为 1% 的 BSA 和 0.03% 的叠氮钠。

快速检测大豆 Kunitz 胰蛋白酶抑制因子的胶体金免疫层析试纸及制备方法

技术领域

[0001] 本发明涉及一种快速检测大豆 Kunitz 胰蛋白酶抑制因子的胶体金免疫层析试纸及制备方法。

背景技术

[0002] 大豆中蛋白质含量丰富,一般为 35%~38%,氨基酸组成平衡,且富含不饱和脂肪酸,是人体和动物体重要的植物蛋白和植物油来源。由于其种植面积广,产量大,长久以来一直被广泛应用于食品和饲料的加工原料,对于人类健康和动物营养具有极高的使用价值。然而大豆中也含有多种抗营养因子,这些抗营养因子在很大程度上影响了大豆的开发与利用。

[0003] 大豆胰蛋白酶抑制因子(Kunitz trypsin inhibitor, KTI)是大豆主要抗营养因子之一,属于多肽类或蛋白质,分子量在 7975~21500D 之间,大约由 72~197 个氨基酸残基组成,约占大豆蛋白的 6%。KTI 是由 Kunitz 于 1945 年首次从大豆中分离出来的,其分子量为 20~25kD,由 181 个氨基酸和少量的半胱氨酸形成的 2 个二硫键组成。KTI 能抑制人和动物肠道内胰腺分泌的胰蛋白酶的活性,降低蛋白质的消化吸收,引起胰腺增生和肥大,导致生长停滞,诱发过敏反应等问题。因此,人们在生产实践中探索各种方法将大豆制品进行适当的加工处理,以减少或消除大豆胰蛋白酶抑制因子,但这些方法都不能完全消除其影响。所以建立有效、准确的检测方法来检测食品及饲料中 KTI 的含量显得尤为重要。

[0004] 免疫层析试纸检测方法具有成本低、快速、便携且易操作等优点,可以用于大批量样品的定性与定量检测,在准确性和灵敏度上也能够满足要求,该法分析过程简单,用作 KTI 的检测有独特优势,是需要优先发展的检测技术。但目前仍没有关于 KTI 免疫层析试纸检测方法的报道,所以该方法将会成为大豆胰蛋白酶抑制因子检测方法的一个发展方向。

发明内容

[0005] 本发明要解决的技术问题:针对现有技术存在的不足,提供一种特异、灵敏、简便、安全、快速检测 KTI 的免疫层析试纸及其制备方法。

[0006] 本发明的技术方案:

一种快速检测 KTI 的胶体金免疫层析试纸,底层为支撑层,中间层为吸附层,保护层固定在吸附层上,吸附层从测试端依次为样品垫、结合垫、纤维素膜和吸水垫。在纤维素膜设有用 KTI 兔源多克隆抗体溶液喷点的检测线以及用羊抗小鼠 IgG 抗体或兔抗小鼠 IgG 抗体溶液喷点的质控线;所述结合垫吸附有胶体金纳米颗粒标记的 KTI 鼠源单克隆抗体。

[0007] 所述支撑层用不吸水的韧性材料制成;样品垫用玻璃纤维棉、尼龙膜、聚偏二氟乙烯膜或聚酯膜制成;结合垫用玻璃纤维棉、聚酯膜、醋酸纤维或尼龙膜制成;纤维素膜用硝酸纤维素膜、纯纤维素膜或羧化纤维素膜制成;吸水垫用吸水滤纸或滤油纸制成。纤维素膜上的隐形检测线和隐形质控线为平行排列的“||”直线式,或为其他类似印记。

[0008] 快速检测 KTI 的胶体金免疫层析试纸的制备方法：包括用胶体金纳米颗粒标记的 KTI 鼠源单克隆抗体(金标单抗)制备结合垫，用 KTI 兔源多克隆抗体溶液喷点隐形检测线，用羊抗小鼠 IgG 抗体或兔抗小鼠 IgG 抗体溶液喷点隐形质控线，然后在支撑层上黏贴样品垫、结合垫、纤维素膜和吸水垫。在所述样品垫、结合垫及吸水垫上覆盖有保护膜，在样品垫与结合垫交界处对应的保护膜上喷点有样品标记线，最后加上保护层。

[0009] 该试纸利用了双抗体夹心检测抗原的原理，当试纸测试端插入待测样品溶液后，待测溶液通过虹吸作用带动待测 KTI 及结合垫中的金标单抗一起向纤维素膜扩散，并最终渗入手柄端的吸水材料层。在扩散过程中，待测 KTI 可先与金标单抗相结合，进而与纤维素膜上喷点的兔源多克隆抗体检测线结合，金标抗体和兔源多克隆抗体分别与样品中被检测的 KTI 分子上的不同抗原决定簇结合，KTI 被夹在金标单抗和兔源多克隆抗体之间，形成金标单抗-抗原-兔源多抗复合物，即双抗体夹心模式，显示红色检测印记“|”；纤维素膜上喷点的羊或兔抗小鼠 IgG 抗体质控线也可与金标抗体结合，形成红色质控印记“|”，即两条红色印记“||”表示为阳性；反之样品溶液中无 KTI 时，则不能与金标抗体结合，同样也不能与纤维素膜上喷点的兔源多克隆抗体检测线结合，不显示红色检测印记，而纤维素膜上喷点的羊或兔抗小鼠 IgG 抗体质控线可与金标抗体结合，显示红色质控线印记“|”，形成一条红色印记“|”表示为阴性。无论结果为阳性还是阴性，都会显示红色质控印记，若不显示则表示试纸失效。

[0010] 本发明的积极有益效果：

(1) 特异性强，灵敏度高。本发明试纸以双抗体夹心原理为基础制备而成，两种抗体分别为胶体金纳米颗粒标记的鼠源单克隆抗体和兔源多克隆抗体。金标抗体中金颗粒与抗体分子之间无共价键形成，二者通过异性电荷间的范德华力相结合，胶体金标记对抗体的特异性及亲和力影响很小，且具有较高的标记率。试验表明，该试纸具有较高的灵敏度，可检测 100ng/mL 的微量 KTI；用该试纸分别检测高浓度的 glycinin、 β -conglycinin、大豆 Bowman-Brik 胰蛋白酶抑制因子和大豆凝集素，浓度为 20mg/mL，结果检测线均不显色，说明该试纸与这几种大豆蛋白均没有交叉反应，具有良好的特异性。

[0011] (2) 简便、快速。使用本发明试纸，无需其他任何试剂和仪器，可现场操作。只需将试纸插入被检样品液中，10min 后即可判定检测结果。

[0012] (3) 结果显示形象、直观、准确。本发明试纸以显示红色印记“||”和“|”（或类似性状）作为检测的阳性和阴性标记，即在纤维素膜上显示两条红色印记“||”（检测线和质控线），表示被检样品中含有 KTI；显示一条红色印记“|”（质控线），表示被检样品中不含 KTI。此结果可用肉眼直接观测，判定形象、直观、准确，简单明了，不易出现假阳性和假阴性等人为误判。

[0013] (6) 节省费用。适用于进行现场检测，费用低廉，节省大量贵重仪器及设备费用。

[0014] (7) 适用范围广，便于推广应用。本发明实现了基于双抗体夹心的原理在快速检测 KTI 胶体金免疫层析试纸中的应用，该试纸操作简便，能满足不同层次人员的需要，包括海关检疫、卫生检疫、质量监测、农畜产品生产企业和饲料加工企业等。本发明在保障食品安全、保护对于大豆过敏的消费者健康以及保障畜禽饲料安全等方面具有极其重要的意义，具有明显的经济效益和社会效益。

[0015] (8) 本发明制备的单克隆抗体的亲和常数达到 10^9 L/mol，并且单克隆抗体的特异

性较好,采用间接竞争 ELISA 测定与其他大豆蛋白的交叉反应率进行鉴定,这几种大豆蛋白竞争物包括大豆球蛋白、 β -伴大豆球蛋白、大豆 Bowman-Brik 胰蛋白酶抑制因子和大豆凝集素,以 KTI 的半数抑制浓度(IC_{50})与各竞争物的 IC_{50} 的百分比作为交叉反应率,单克隆抗体与这几种大豆蛋白竞争物之间基本没有交叉反应,结果表明其对于 KTI 具有良好的特异性。

附图说明

[0016] 图 1 为本发明的免疫层析试纸的结构示意图。

[0017] 图 2 为本发明的免疫层析试纸的俯视结构示意图。

[0018] 图中,1 为支撑层,2 为样品垫,3 为结合垫,4 为纤维素膜,5 为吸水垫,6 为检测线,7 为质控线,8-1 为测试端保护膜,8-2 为手柄端保护膜,9 为样品标记线。

具体实施方式

[0019] 以下实施例是为了更好的解释本发明,但并不表示对本发明的特别限定,如果没有特别说明,其中的百分含量均可理解为重量百分比。

[0020] 本发明试纸的制备过程包括:KTI 兔源多克隆抗体的制备、KTI 鼠源单克隆抗体的制备、结合垫的制备、样品垫的制备、纤维素膜的制备和试纸的组装等步骤。

[0021] 1、KTI 兔源多克隆抗体的制备:

取清洁级 3 月龄新西兰大白兔,用 KTI 溶液进行免疫,颈部皮下分 4~6 点注射。首次免疫剂量为 200 μ g/只,用无菌 PBS 稀释 KTI 与等量弗氏完全佐剂(FCA)混合,25000r/min 充分乳化 10min;加强免疫剂量增大,为 300 μ g/只,免疫 4 次,用无菌 PBS 稀释 KTI 与等量弗氏不完全佐剂(FIA)混合,25000r/min 充分乳化 10min。共免疫 4 次,每次免疫间隔 3 周,最后一次免疫 30 天后,以 ELISA 法测定效价,并鉴定其敏感性和特异性,心脏采血并分离收集血清。以饱和硫酸铵盐析法纯化兔源多克隆抗体,即取 1 份血清加 2 份 PBS (pH7.2)混匀,加等体积饱和硫酸铵溶液混匀,置 4 $^{\circ}$ C 冰箱 12h,4 $^{\circ}$ C、10000rpm 离心 30min,弃上清,再以适量 PBS (pH7.2)溶解沉淀,加饱和硫酸铵溶液至终浓度 33%,置 4 $^{\circ}$ C 冰箱 12h,4 $^{\circ}$ C、10000rpm 离心 30min,弃上清,以适量 PBS (pH7.2)溶解沉淀,置 4 $^{\circ}$ C 冰箱内用 PBS (pH7.2)透析 48~72h,中间换液 6~8 次,4 $^{\circ}$ C、12000rpm 离心 15min,收集上清,得初步纯化的 KTI 兔源多克隆抗体。然后采用 Protein G 亲和层析柱进行进一步纯化,先用 10 倍柱体积 PBS 起始缓冲液平衡层析柱,将初步纯化的 KTI 兔源多克隆抗体用起始缓冲液 1:1 稀释后,通过 0.22 μ m 一次性无菌过滤器过滤后加样,随后用 10 倍柱体积的起始缓冲液流洗,除去未结合抗体,最后用 2 倍柱体积的洗脱缓冲液(0.1mol/L 甘氨酸-盐酸, pH 2.5)洗脱,用盛有中和液(0.1mol/L Tris-HCl, pH 9.0)的离心管收集,再用 PBS 充分透析,备用。

[0022] 2、KTI 鼠源单克隆抗体的制备:

取 SPF 级 6~8 周龄 BALB/c 小鼠,用 KTI 溶液进行免疫。剂量为 50 μ g/只,背部皮下分 4~6 点注射。免疫 4 次,首次免疫用无菌 PBS 稀释 KTI 与等量 FCA 混合,加强免疫用无菌 PBS 稀释 KTI 与等量 FIA 混合,25000r/min 充分乳化 10min,免疫间隔 3 周。确定抗体效价符合要求后以 50 μ g/只的剂量不加佐剂进行超强免疫,之后 3~4 天将免疫小鼠眶下窦采血,分离阳性血清;脱颈致死,用体积比 75%的酒精浸泡小鼠 5~10min 消毒体表,无菌操作取其脾脏,

将脾脏剪碎并研磨,经 120 目尼龙纱布过滤,1000rpm 离心 10min,收集脾细胞。将 1×10^8 的脾细胞与 NS0 骨髓瘤细胞按 10:1 的比例混合,1000rpm 离心 10min,弃上清,细胞沉淀物于 37℃ 水浴中缓慢加入 0.7~1.0mL 的 PEG1500 作用 1min,然后缓慢加入无血清 1640 培养基 15mL,以终止 PEG 的作用;37℃ 水浴 5~10 min,1000rpm 离心 10min 弃上清,将细胞沉淀物重悬于 HAT 选择培养基中,并加入 96 孔细胞培养板孔(100 μ L~200 μ L/孔),置于 37℃、5% 的 CO₂ 培养箱中培养。培养 10~14 天,用间接 ELISA 和间接竞争 ELISA 法进行阳性孔筛选,选择强阳性、抑制率高、细胞生长旺盛的孔进行 2~3 次有限稀释克隆化,将阳性孔扩大培养后建立杂交瘤细胞株。采用小鼠体内诱生腹水法获得腹水,再经纯化得到鼠源单克隆抗体,纯化方法采用上述兔源多克隆抗体制备中的饱和硫酸铵盐析法和亲和层析法。

[0023] 通过 ELISA 饱和法测定鼠源单克隆抗体的亲和常数能够达到 10^9 L/mol。利用 Sigma 鼠源单克隆抗体亚型鉴定试剂,鉴定出该单克隆抗体的亚型为 IgG1 型。单克隆抗体的特异性首先采用间接竞争 ELISA 测定与其他大豆蛋白的交叉反应率进行鉴定,这几种大豆蛋白竞争物包括大豆球蛋白(glycinin)、 β -伴大豆球蛋白(β -conglycinin)、大豆 Bowman-Brik 胰蛋白酶抑制因子和大豆凝集素,以 KTI 的半数抑制浓度(IC₅₀)与各竞争物的 IC₅₀ 的百分比作为交叉反应率,结果如表 1 所示,单克隆抗体与这几种大豆蛋白竞争物之间基本没有交叉反应,结果表明其对于 KTI 具有良好的特异性。

[0024] 表 1 KTI 鼠源单克隆抗体与竞争物的交叉反应

竞争物	半数抑制浓度 IC ₅₀ (ng/mL)	交叉反应率 CR (%)
Glycinin	$>1.0 \times 10^5$	<0.5
β -conglycinin	$>1.0 \times 10^5$	<0.5
Bowman-Brik 胰蛋白酶抑制因子	$>1.0 \times 10^5$	<0.5
大豆凝集素	$>1.0 \times 10^5$	<0.5

3、样品垫的制备

样品垫用玻璃纤维棉、尼龙膜、聚偏二氟乙烯 PVDF 膜或聚酯膜制备,将纤维材料剪成宽 1.5cm 规格的条带,将其放入样品垫封闭液中浸泡 30min,于 37℃ 烘干,备用。

[0025] 4、结合垫的制备

采用柠檬酸钠还原法制备胶体金溶液,即在沸腾的 0.01~0.02% 氯金酸溶液中加入 1% 的新配制柠檬酸钠溶液,获得直径 15~20nm 的胶体金溶液,用 0.1mol/L 的 K₂CO₃ 调节 pH 值至 8.5~9.5,置 2~8℃ 保存备用。以 1:2000 的标记比将待标记的 KTI 鼠源单克隆抗体加入 pH 8.5~9.5 的胶体金溶液中,标记 30min 后,加入 10% 的 BSA,静置 30min,4℃、13000rpm 离心 30min 弃上清。沉淀用含 2% BSA 的 0.02mol/L 四硼酸钠溶液复溶,4℃、13000rpm 离心 30min 弃上清。将胶体金纳米颗粒沉淀用 25mL 的 TB 重悬液(重悬液的组成:0.02mol/L 四硼酸钠溶液中含 1% 的 BSA 和 0.03% 的叠氮钠)重悬,获得胶体金标记的 KTI 鼠源单克隆抗体。将 2~5 倍稀释的胶体金标记抗体喷点于玻璃纤维绵上制备结合垫,56℃ 干燥后密封避光保存。

[0026] 5、纤维素膜的制备

纤维素膜用硝酸纤维素膜、纯纤维素膜或羧化纤维素膜,剪切成宽 1.5cm 规格的条带,用点样仪在纤维素膜上不同位置分别喷点 KTI 兔源多克隆抗体和羊抗小鼠 IgG 抗体(或兔抗小鼠 IgG 抗体),制作隐形的检测线和质控线,于 40℃ 烘干后用 2% BSA 溶液充分封闭,室温干燥后密封避光保存备用。

[0027] 其中羊抗小鼠 IgG (或兔抗小鼠 IgG) 抗体的制备方法如下:

首先利用饱和硫酸铵盐析法提取 KTI 阴性小鼠血清 IgG, 然后以 200 μ g~500 μ g/ 只的剂量经皮下或肌肉注射清洁级山羊或新西兰大白兔 3~4 次, 末次免疫 30 天后, 以 ELISA 测定其血清效价达到 1:10000 以上时, 心脏或动脉采血, 分离收集高免血清, 以饱和硫酸铵盐析法和亲和层析法提取羊抗小鼠或兔抗小鼠 IgG 抗体, 用于 KTI 检测试纸质控线的喷点。

[0028] 6、免疫层析试纸的组装:

将样品垫、结合垫、纤维素膜、吸水垫从左至右依次黏贴在带有粘合剂的支撑层上, 彼此交界处重叠 2~3mm, 然后切成 3~4mm 宽的试纸即可。

[0029] 7、免疫层析试纸的检测原理:

当试纸测试端插入待测样品溶液后, 待测溶液通过虹吸作用带动待测 KTI 及结合垫中的金标抗体一起向纤维素膜扩散, 并最终渗入手柄端的吸水材料层。在扩散过程中, 待测 KTI 可先与金标单抗相结合, 进而与纤维素膜上喷点的 KTI 兔源多克隆抗体检测印记结合, 显示检测线, 形成红色检测线带“|”; 纤维素膜上喷点的羊或兔抗小鼠 IgG 抗体质控印记也可与金标抗体结合, 形成红色质控线带“|”, 即两条红色线带“||”表示为阳性; 反之样品溶液中无 KTI 时, 则不能与金标抗体结合, 同样也不能与纤维素膜上喷点的 KTI 兔源多克隆抗体检测印记结合, 不显示红色检测线带, 而纤维素膜上喷点的羊或兔抗小鼠 IgG 抗体质控印记可与金标抗体结合, 显示红色质控线带“|”, 形成一条红色带“|”表示为阴性。如果纤维素膜上没有任何红色线带显示, 则表明试纸已失效。

[0030] 以下用实例具体说明本发明试纸的结构、检测方法及特性。

[0031] 实施例一: 参见图 1 和图 2。图中 1 为支撑层, 用塑胶薄片条制成; 2 为样品垫, 用玻璃纤维棉制成; 3 为结合垫, 吸附有胶体金纳米颗粒标记的 KTI 鼠源单克隆抗体的玻璃纤维棉; 4 为纤维素膜, 采用硝酸纤维素膜; 手柄端的吸水垫 5 用吸水滤纸制成。将样品垫 2、结合垫 3、纤维素膜 4、吸水垫 5 从左至右依次黏贴固定在支撑层 1 上, 彼此之间交界处纤维互相重叠。在纤维素膜 4 上设有隐形检测线 6, 用 KTI 兔源多克隆抗体溶液制成; 隐形质控线 7 用羊抗小鼠 IgG 抗体溶液在纤维素膜上喷点制成, 两条线带平行排列, 形成组合印迹带“||”。

[0032] 8-1 为覆盖在样品垫 2 和结合垫 3 上面的样品端白色保护膜, 8-2 为覆盖在吸水垫 5 上面的其它颜色保护膜(如黄色), 9 为样品标记线, 该标记线位于样品垫 2 与结合垫 3 交界处对应的白色保护膜上偏向样品垫 2 一侧约 0.5cm 处, 在标记线左侧保护膜上印有箭头及 Max 字样。

[0033] 待测样品的制备及检测步骤:

检测脱脂奶粉: 将样品用含有 0.01mol/L NaHSO_3 的水溶液以 1:15 的料液比溶解后, 1mol/L 的 NaOH 调 pH 至 9.0, 在 45 $^{\circ}\text{C}$ 水浴条件下搅拌 1h, 将混合溶液在常温下 10000rpm 离心 30min, 分离上清液用于检测。

[0034] 操作方法: 将 KTI 试纸样品端插入待测样品中, 插入深度不超过标记线, 约 10~20 秒钟取出试纸, 水平放置, 10min 后观察判定检测结果。

[0035] 结果判定: (a) 阳性 如果在纤维素膜上显示有两条红色印迹带“||”, 表示检测结果为阳性, 说明在待测样品中含有 KTI; (b) 阴性 如果在纤维素膜上显示有一条红色印迹带“|”, 表示检测结果为阴性, 说明在待测样品中不含 KTI; (c) 失效 如果在纤维素膜上

没有红色带显示,则表明试纸已失效。

[0036] 实施例二:试纸结构和实施例一基本相同,不同之处在于:样品垫 2 用尼龙膜制成,纤维素膜 4 采用纯纤维素膜。

[0037] 检测饲料:先将样品进行粉碎,过 60 目筛,再用石油醚对粉碎后的样品进行脱脂处理。随后的样品制备方法同实施例一。

[0038] 操作方法和结果判定同实施例一。

[0039] 实施例三:试纸结构和实施例一基本相同,不同之处在于:样品垫 2 用聚偏二氟乙烯 PVDF 膜制成,隐形质控印迹 7 用兔抗小鼠 IgG 抗体溶液在纤维素膜上制成,纤维素膜 4 采用羧化纤维素膜。

[0040] 检测饲料:样品制备方法同实施例二。

[0041] 操作方法和结果判定同实施例一。

[0042] 实施例四:试纸结构和实施例一基本相同,不同之处在于:样品垫 2 用聚酯膜制成,纤维素膜 4 采用羧化纤维素膜。检测样品、操作方法和结果判定同实施例一。

[0043] 实施例五:试纸结构和实施例一基本相同,不同之处在于:样品垫 2 用尼龙膜制成,隐形质控印迹 7 用兔抗小鼠 IgG 抗体溶液在纤维素膜上制成。检测样品、操作方法和结果判定同实施例一。

[0044] 实施例六:本发明试纸的敏感性和特异性试验。

[0045] 敏感性:取十个梯度的 KTI 标准溶液,浓度分别为 0ng/mL, 50ng/mL, 100ng/mL, 200ng/mL, 400ng/mL, 800ng/mL, 1600ng/mL, 3200ng/mL, 6400ng/mL, 12800ng/mL。各取上述浓度的标准溶液 100μL,用实施例一中的试纸进行检测,10min 后观察结果,以检测线显色结果评价试纸的敏感性。结果表明,试纸的灵敏度可以达到 100ng/mL。

[0046] 特异性:用该试纸检测分别检测高浓度的 glycinin、 β -conglycinin、大豆 Bowman-Birk 胰蛋白酶抑制因子和大豆凝集素,浓度为 20mg/mL,结果检测线均不显色,说明该试纸与这几种大豆蛋白均没有交叉反应,具有良好的特异性。

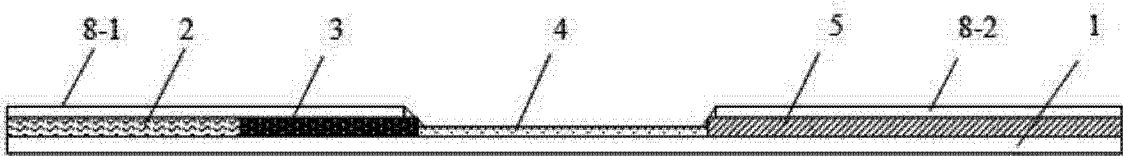


图 1

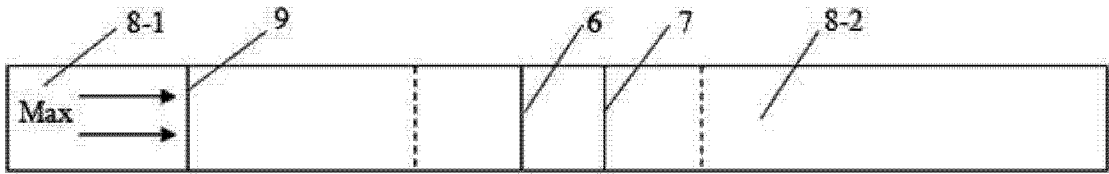


图 2

专利名称(译)	快速检测大豆Kunitz胰蛋白酶抑制因子的胶体金免疫层析试纸及制备方法		
公开(公告)号	CN104914249A	公开(公告)日	2015-09-16
申请号	CN201510396691.6	申请日	2015-07-08
[标]申请(专利权)人(译)	河南省农业科学院		
申请(专利权)人(译)	河南省农业科学院		
当前申请(专利权)人(译)	河南省农业科学院		
[标]发明人	邓瑞广 胡晓飞 王耀 王方雨		
发明人	邓瑞广 胡晓飞 王耀 李青梅 王方雨 杨继飞 郝天红		
IPC分类号	G01N33/68 G01N33/558 G01N33/577 G01N33/532 C07K16/16 C07K16/06		
CPC分类号	C07K16/06 C07K16/16 G01N33/532 G01N33/558 G01N33/577 G01N33/68 G01N33/6803 G01N2333/81		
代理人(译)	张爱军		
其他公开文献	CN104914249B		
外部链接	Espacenet SIPO		

摘要(译)

本发明涉及一种快速检测大豆Kunitz胰蛋白酶抑制因子的胶体金免疫层析试纸及制备方法，该试纸基于双抗体夹心的原理检测KTI，试纸含有支撑层、吸附层、保护层，吸附层从测试端依次为样品垫、结合垫、纤维素膜和吸水垫。结合垫吸附有KTI的特异性抗体，纤维素膜设有用KTI免源多克隆抗体溶液喷点的检测线以及用羊抗小鼠IgG抗体或兔抗小鼠IgG抗体溶液喷点的质控线，KTI的特异性抗体采用胶体金纳米颗粒标记的KTI鼠源单克隆抗体。本发明的免疫层析试纸特异性强、灵敏度高，检测简便、直观、准确，成本低，适用范围广，易于推广应用。

