



(12)发明专利

(10)授权公告号 CN 104914249 B

(45)授权公告日 2016.09.14

(21)申请号 201510396691.6

G01N 33/577(2006.01)

(22)申请日 2015.07.08

G01N 33/532(2006.01)

(65)同一申请的已公布的文献号

C07K 16/16(2006.01)

申请公布号 CN 104914249 A

C07K 16/06(2006.01)

(43)申请公布日 2015.09.16

(56)对比文件

(73)专利权人 河南省农业科学院

CN 204882573 U,2015.12.16,

地址 450002 河南省郑州市金水区花园路
116号

US 4959310 A,1990.09.25,权利要求1-3,
实施例1-4.

(72)发明人 邓瑞广 胡晓飞 王耀 李青梅
王方雨 杨继飞 郝天红

Yao Wang, et al..Rapid and Sensitive
Detection of the Food Allergen Glycinin
in Powdered Milk Using a Lateral Flow
Colloidal Gold Immunoassay Strip Test.
《Journal of Agricultural and Food
Chemistry》.2015,第63卷(第8期),第2172-2178
页.

(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

审查员 陈伟潘

(51)Int.Cl.

G01N 33/68(2006.01)

G01N 33/558(2006.01)

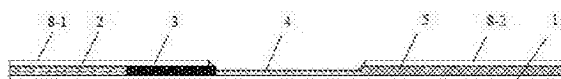
权利要求书3页 说明书6页 附图1页

(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;

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℃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 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。

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。

5.根据权利要求1-4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。

6.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。

7.如权利要求6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0.22μm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。

8.如权利要求6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℃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，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，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。

9. 如权利要求6-8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℃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。

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:

[0007] 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。

[0008] 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,或其他类似印记。

[0009] 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。

[0010] 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。

[0011] 本发明的积极有益效果：

[0012] (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gIycinin、 β -congIycinin、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。

[0013] (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。

[0014] (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。

[0015] (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。

[0016] (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。

[0017] (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-Birk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

[0018] 图1为本发明的免疫层析试纸的结构示意图。

[0019] 图2为本发明的免疫层析试纸的俯视结构示意图。

[0020] 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

[0021] 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。

[0022] 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。

[0023] 1、KTI兔源多克隆抗体的制备:

[0024] 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。

[0025] 2、KTI鼠源单克隆抗体的制备:

[0026] 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。

[0027] 通过ELISA饱和法测定鼠源单克隆抗体的亲和常数能够达到10⁹L/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-Birk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。

[0028] 表1 KTI鼠源单克隆抗体与竞争物的交叉反应

[0029]

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-Birk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

[0030] 3、样品垫的制备

[0031] 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。

[0032] 4、结合垫的制备

[0033] 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。

[0034] 5、纤维素膜的制备

[0035] 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。

[0036] 其中羊抗小鼠IgG(或兔抗小鼠IgG)抗体的制备方法如下:

[0037] 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。

[0038] 6、免疫层析试纸的组装:

[0039] 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。

[0040] 7、免疫层析试纸的检测原理:

[0041] 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。

[0042] 以下用实例具体说明本发明试纸的结构、检测方法及特性。

[0043] 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“||”。

[0044] 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。

[0045] 待测样品的制备及检测步骤:

[0046] 检测脱脂奶粉:将样品用含有0.01mol/L NaHSO₃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℃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。

[0047] 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。

[0048] 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。

[0049] 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。

[0050] 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。

[0051] 操作方法和结果判定同实施例一。

[0052] 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。

[0053] 检测饲料：样品制备方法同实施例二。

[0054] 操作方法和结果判定同实施例一。

[0055] 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。

[0056] 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。

[0057] 实施例六：本发明试纸的敏感性和特异性试验。

[0058] 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100mL，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。

[0059] 特异性：用该试纸检测分别检测高浓度的gIycinin、 β -congIycinin、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。

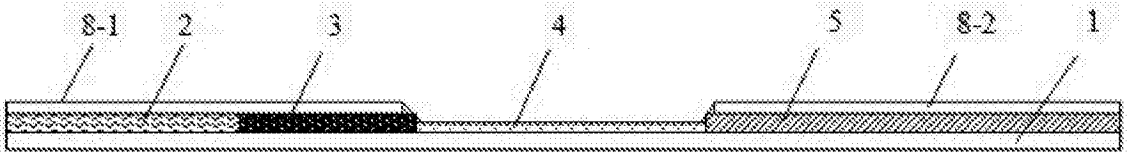


图1

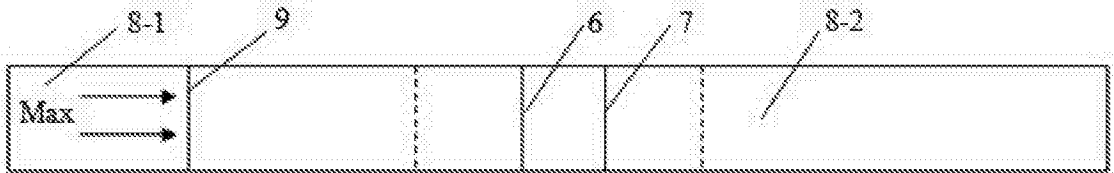


图2

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	CN104914249B	公开(公告)日	2016-09-14
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	CN104914249A		
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。

