



(12) 发明专利申请

(10) 申请公布号 CN 105628917 A

(43) 申请公布日 2016. 06. 01

(21) 申请号 201511003578. 3

(22) 申请日 2015. 12. 25

(83) 生物保藏信息

CCTCC NO :C2010107 2010. 12. 07

(71) 申请人 广州甘蔗糖业研究所

地址 510316 广东省广州市海珠区石榴岗路
10 号

申请人 广西农垦糖业集团股份有限公司

(72) 发明人 梁达奉 曾练强 黄曾慰 马步
柳颖 常国炜

(74) 专利代理机构 广州嘉权专利商标事务所有
限公司 44205

代理人 郑莹

(51) Int. Cl.

G01N 33/558(2006. 01)

G01N 33/531(2006. 01)

权利要求书1页 说明书5页 附图2页

(54) 发明名称

检测 α -葡聚糖的金标试纸及检测方法

(57) 摘要

本发明公开了一种检测 α -葡聚糖的金标试纸及检测方法,包括底板,底板上依次相连的样品垫、金标垫、硝酸纤维素膜以及吸样垫。在硝酸纤维素膜上设有检测线抗原和质控线抗体,在金标垫上设有金标抗体。根据胶体金免疫层析试验(GICA)原理制成,选取抗 α -葡聚糖特异性单克隆抗体,采用竞争抑制免疫层析测 α -葡聚糖。应用本发明试纸检测 α -葡聚糖,特异性强,灵敏度高,操作简单、方便、快捷,不需要特殊仪器设备和专业培训,结果明晰易辨,经济实用。

1. 一种检测 α -葡聚糖的金标试纸,其包括底板,底板上依次相连的样品垫、金标垫、反应膜以及吸样垫;

在金标垫上包被有胶体金标记的抗 α -葡聚糖的单克隆抗体或抗 α -葡聚糖的多克隆抗体。

2. 根据权利要求1所述的金标试纸,其特征在于,所述反应膜位于金标垫一端设有检测区,远离金标垫一端设有质控区,所述检测区上设置了1条或多条互相平行的检测线,检测线上包被有 α -葡聚糖-蛋白交联物。

3. 根据权利要求2所述的金标试纸,其特征在于,所述质控区设置有质控线,质控线上包被有羊抗鼠抗体IgG。

4. 根据权利要求1所述的金标试纸,其特征在于,所述 α -葡聚糖-蛋白交联物的制备方法为:

1)将 α -葡聚糖与蛋白混合,用水溶解,冷冻干燥,研磨成粉;

2)将粉末置于50~60℃的恒温,反应至少3天,得到 α -葡聚糖-蛋白交联物。

5. 根据权利要求4所述的金标试纸,其特征在于,所述蛋白为牛血清白蛋白或卵清蛋白中的一种。

6. 根据权利要求4所述的金标试纸,其特征在于,所述 α -葡聚糖的分子量在10~2000kDa。

7. 根据权利要求1所述的金标试纸,其特征在于,所述抗 α -葡聚糖的单克隆抗体的制备方法如下:

1)将 α -葡聚糖-蛋白交联物与佐剂混合,乳化,注射到动物体内,所述 α -葡聚糖-蛋白交联物如权利要求4-6任一项的方法制备得到;

2)选取血清效价高的动物体,取其脾细胞制成悬液,并与对数生长期的瘤细胞混合,介导融合、筛选得到可以分泌 α -葡聚糖特异性单克隆抗体的杂交瘤细胞株;

3)使用杂交瘤细胞生产得到 α -葡聚糖特异性单克隆抗体或使用腹水法生产得到 α -葡聚糖特异性单克隆抗体。

8. 根据权利要求1所述的金标试纸,其特征在于,所述抗 α -葡聚糖的单克隆抗体由杂交瘤细胞株D9分泌得到,所述杂交瘤细胞株D9已于2010年12月7日保藏于中国典型培养物保藏中心,保藏编号为CCTCC NO:C2010107。

9. 一种半定量检测 α -葡聚糖的试剂盒,包括外盒体和盒内支架,其特征在于:所述盒内支架上设置有试纸条凹槽可放置权利要求1~8任一项所述的金标试纸。

10. 根据权利要求9所述的半定量检测 α -葡聚糖的试剂盒,其特征在于:所述盒内支架上还设置有若干试剂管孔,孔内放置有试剂管,试剂管中分别盛装的试剂包括 α -葡聚糖标准品溶液、样品稀释液。

检测 α -葡聚糖的金标试纸及检测方法

技术领域

[0001] 本发明涉及一种半定量检测 α -葡聚糖的金标试纸,可广泛应用于制糖、医疗等行业中。

背景技术

[0002] α -葡聚糖(dextran)又称右旋糖酐,是一类D-吡喃葡萄糖的聚合物的总称,通过 α -1, 6 糖苷键形成主链,少量的支链部分则由 α -1, 2, α -1, 3 和 α -1,4糖苷键形成。分子式为 $(C_6H_{10}O_5)_n$,分子量一般由数万到数百万,从可溶性小分子到不可溶的高分子,呈胶粘状,粘度随分子量和浓度的增加而增加。 α -葡聚糖呈白色粉末状,无臭、无味,通常可溶于水、蔗糖溶液、氯化钠溶液中,溶解性随分子量和浓度的增加而下降。不溶于乙醇,常温稳定,加热逐渐变色或分解。用稀酸水解后,得部分解聚产物;若长时间水解,可得葡萄糖。右旋糖酐经碱性降解反应,产物的粘度随水解时间的长短而显著不同。 α -葡聚糖是最早发现的微生物多糖,是世界上第一个工业化生产的微生物多糖,也是美国FDA 批准的第一种可用于食品的微生物胞外多糖。

[0003] 在甘蔗制糖生产过程中出现的 α -葡聚糖,俗称“蔗饭”。新鲜甘蔗中 α -葡聚糖的含量很少,几乎为零。但甘蔗如受到刀伤或压伤、病虫害、火烧、霜冻或在收割后放置长时间,就会受到肠膜明串珠菌(*Leuconostoc mesenteroides*)、链球菌属(*Streptococcus*)等微生物的感染而形成葡聚糖。这些微生物在适宜的温度和湿度下,能够分泌葡聚糖蔗糖酶(dextranucrase),催化蔗糖生成葡萄糖并聚合而生成多糖体,从而产生 α -葡聚糖。从蔗汁到精制产品,制糖工艺过程自始至终存在着 α -葡聚糖引起的不良影响。蔗汁中 α -葡聚糖的存在意味着糖分转化损失,粘度增大,澄清、过滤、蒸发、煮糖(结晶)、分蜜受影响,回收降低,成本增加,产品质量下降,影响产品的适用性。因此, α -葡聚糖的监测成为糖厂生产控制的一个重要技术。

[0004] 制糖工业中 α -葡聚糖的测定一般可用Haze/ICUMSA 法、Robert's 铜法、Potical Activity Ltd.DASA 法、酶解法等,但这些方法都有较大的局限性,如准确度不高、操作繁琐、不适用所有糖品等缺点。其中测定 α -葡聚糖的两个主流方法,HAZE法和Roberts方法,或者基于这两种原理的衍生方法,都属于化学测定法。这两种测试方法都要利用到 α -葡聚糖在酒精溶液中沉淀的特性。 α -葡聚糖的这些定量测定方法在长期以来的应用中存在可靠性、精确性、特异性均不高,价格昂贵和操作繁琐费时的缺点。而高效液相色谱法,则存在着仪器设备要求高,测试时间长,样本处理难的问题。

[0005] 胶体金免疫层析技术作为一种检测技术,其特点是方便快捷,除少量试剂外无需任何仪器设备,几分钟即可肉眼观察结果。胶体金试纸条的样品前处理简单,抗干扰能力强,能满足分析要求,适用于大量样品的定性和半定量初筛。本发明的半定量检测 α -葡聚糖的胶体金试纸条具有ELISA 方法的高灵敏度,大幅降低检测成本。对于在制糖行业中便捷、准确检测原料、中间物料、产品及副产品中的 α -葡聚糖是很有意义的。检索结果表明,尚未有半定量检测 α -葡聚糖浓度的方法,也没有利用胶体金法对 α -葡聚糖进行半定量检测的报

道。

发明内容

[0006] 本发明的目的在于提供一种检测 α -葡聚糖的金标试纸及检测方法。

[0007] 本发明所采取的技术方案是：

一种检测 α -葡聚糖的金标试纸，其包括底板，底板上依次相连的样品垫、金标垫、反应膜以及吸样垫；

在金标垫上包被有胶体金标记的抗 α -葡聚糖的单克隆抗体或抗 α -葡聚糖的多克隆抗体。

[0008] 反应膜位于金标垫一端设有检测区，远离金标垫一端设有质控区，所述检测区上设置了1条或多条互相平行的检测线，检测线上包被有 α -葡聚糖-蛋白交联物。

[0009] 所述质控区设置有质控线，质控线上包被有羊抗鼠抗体IgG。

[0010] 所述 α -葡聚糖-蛋白交联物的制备方法为：

- 1)将 α -葡聚糖与蛋白混合，用水溶解，冷冻干燥，研磨成粉；
- 2)将粉末置于50~60℃的恒温，反应至少3天，得到 α -葡聚糖-蛋白交联物。

[0011] 作为优选的，所述蛋白为牛血清白蛋白或卵清蛋白中的一种。

[0012] 作为优选的，所述 α -葡聚糖的分子量在10~2000kDa。

[0013] 所述抗 α -葡聚糖的单克隆抗体的制备方法如下：

- 1)将 α -葡聚糖-蛋白交联物与佐剂混合，乳化，注射到动物体内；
- 2)选取血清效价高的动物体，取其脾细胞制成悬液，并与对数生长期的瘤细胞混合，介导融合、筛选得到可以分泌 α -葡聚糖特异性单克隆抗体的杂交瘤细胞株；
- 3)使用杂交瘤细胞生产得到 α -葡聚糖特异性单克隆抗体或使用腹水法生产得到 α -葡聚糖特异性单克隆抗体。

[0014] 作为优选的，所述抗 α -葡聚糖的单克隆抗体由杂交瘤细胞株D9分泌得到，所述杂交瘤细胞株D9已于2010年12月7日保藏于中国典型培养物保藏中心，保藏编号为CCTCC NO: C2010107。

[0015] 一种半定量检测 α -葡聚糖的试剂盒，包括外盒体和盒内支架，所述盒内支架上设置有试纸条凹槽可放置金标试纸。

[0016] 作为优选的，所述盒内支架上还设置有若干试剂管孔，孔内放置有试剂管，试剂管中分别盛装的试剂包括 α -葡聚糖标准品溶液、样品稀释液。

[0017] 本发明检测 α -葡聚糖的金标试纸的原理是：用胶体金标记抗 α -葡聚糖的单克隆抗体，将该金标抗体包被于金标垫上。在检测线上包被有一定量的 α -葡聚糖-蛋白交联物。当将待检样品到达金标垫后，若样品中含有一定量的 α -葡聚糖时，则 α -葡聚糖会与胶体金标记的抗体结合，从而抑制金标抗体与检测线上的抗原结合，无法聚集在检测线。若样品中所含的 α -葡聚糖低于一定的量，不足以与全部的胶体金标记的抗体结合，则剩余未结合的金标抗体将与检测线上的抗原结合，聚集在检测线。通过在试纸条上设置多条间隔的检测线，可以实现 α -葡聚糖的半定量检测。制作该试纸条时，通过确定各检测线上包被的 α -葡聚糖-蛋白交联物的量，限定每条检测线只能够结合一定量的胶体金标记抗体。距离胶体金垫由近到远，检测线显色时所代表的 α -葡聚糖含量依次减少。根据检测结果中出现检测线的数

量,判断样品中 α -葡聚糖的浓度范围。

附图说明

[0018] 图1为本发明检测 α -葡聚糖的金标试纸结构示意图(1为样品垫,2为金标垫,3为反应膜,4为检测线,5为质控线,6为吸样垫);

图2为检测结果示意图(α -葡聚糖浓度小于5ng/mL);

图3为检测结果示意图(α -葡聚糖浓度为5-20ng/mL);

图4为检测结果示意图(α -葡聚糖浓度为20-50ng/mL);

图5为检测结果示意图(α -葡聚糖浓度大于50ng/mL)。

具体实施方式

[0019] 下面结合实施例对本发明作进一步的说明,但并不局限于此。

[0020] 实施例1: α -葡聚糖金标试纸条的制备方法

1. 胶体金的制备:

采用柠檬酸三钠还原法制备胶体金。取50mL 0.1mg/mL的氯金酸溶液,100 r/min搅拌,加热至沸腾,加入2mL 10mg/mL柠檬酸钠溶液,保持原有的反应温度和搅拌速度,继续沸腾反应5min,至溶液颜色刚刚变为清亮橘红色后停止反应。冷却,并置于棕色瓶中4℃避光保存。经电镜检测,胶体金粒径为10-15nm。

[0021] 2. α -葡聚糖和BSA、OVA交联物的制备

将 α -葡聚糖Dextran T-40与BSA按1:1比例混合,用水溶解调至6% (W/V),冷冻干燥。研磨成粉末状后于60℃环境放置,并在容器底部放置饱和的KBr溶液反应7天。每天取样进行SDS-PAGE电泳,过碘酸-Schiff试剂法染色和考马斯亮兰R250染色鉴定,制得Dextran T-40-BSA交联物。用同样的方法制备Dextran T-40-OVA交联物。

[0022] 3. 单克隆抗体的制备

用 α -葡聚糖Dextran T-40与BSA的交联物免疫小鼠,取免疫小鼠的脾细胞与小白鼠骨髓瘤细胞杂交融合制备杂交瘤细胞,间接ELISA方法筛选阳性克隆,同时采用有限稀释法进行杂交瘤细胞的亚克隆和培养,筛选能够稳定分泌抗 α -葡聚糖单克隆抗体的细胞株。其中一株杂交瘤细胞株D9已于2010年12月7日保藏于中国典型培养物保藏中心(CHINA CENTER FOR TYPE CULTURE COLLECTION, CCTCC);地址:中国,武汉,武汉大学;保藏编号为CCTCC NO:C2010107。

[0023] 将杂交瘤细胞株D9体外培养至一定密度后接种到BALB/C小鼠的腹腔,收取所诱导的腹水,通过亲和层析方法纯化获得抗 α -葡聚糖单克隆抗体。

[0024] 4. 胶体金标记物的制备

取100mL胶体金溶液用0.1 mol/L 碳酸钾溶液调至pH 8.0,边搅拌边加入0.6 mg 抗 α -葡聚糖单克隆抗体,室温搅拌60min,再逐滴加入5%的牛血清白蛋白(BSA),使其终浓度为1%,搅拌后静置1h, 2000 r/min、4℃ 低速离心30 min,取上清。将上一步得到的上清液于12000 r/min、4℃ 高度离心15 min,弃上清,收集沉淀。用0.01M、pH7.2 的PBS 缓冲液(含1% BSA)溶解沉淀,置于4℃备用。

[0025] 5. 检测膜片的制备

用0.01M、pH7.2 的PBS 缓冲液将 α -葡聚糖Dextran T-40-OVA交联物稀释到三个不同浓度,由高到低分别喷涂在硝酸纤维素膜上,每条线分别喷涂20 μ I,线宽1mm,线间距5mm,其包被量代表了能够检测出5ng/mL,20 μ I,50ng/mL 的 α -葡聚糖的量。形成检测线(T线),真空干燥。将0.5mg/mL的羊抗鼠抗体IgG喷涂在硝酸纤维素膜上,浓度为0.5 μ I/cm,线宽为1mm,作为质控线(C线),用1% BSA 进行封闭,真空干燥,4℃保存。

[0026] 6. 试纸条的组装

将样品垫(玻璃纤维膜)、胶体金垫、硝酸纤维素膜和吸样垫顺序依次粘贴在PVC底板上。硝酸纤维素膜位于底板中部,硝酸纤维素膜在检测线区域的一端与胶体金垫的连接,控制线区域的一端与吸样垫连接,样品垫与胶体金垫搭接。切成宽度为5mm 的试纸条,也可将试纸条装入一个塑料卡中制成检测卡。放入带有干燥剂的密封铝箔袋中保存备用。

[0027] 实施例2:本发明金标试纸的使用方法

取样品100 μ I滴加到样品垫,开始计时,15min后观察检测结果。

[0028] 本试纸条上所设计的三条检测线所代表的样品浓度为5ng/mL,20ng/mL,50ng/mL,所得结果判读标准如下:

1. 当质控线无显示(图1),测试结果无效。

[0029] 2. 当出现质控线和三条检测线时(图2),测得 α -葡聚糖浓度小于5ng/mL。

[0030] 3. 当出现质控线和二条检测线时(图3),测得 α -葡聚糖浓度为5-20ng/mL。

[0031] 4. 当出现质控线和一条检测线时(图4),测得 α -葡聚糖浓度为20-50ng/mL。

[0032] 5. 当出现质控线,无检测线时(图5),测得 α -葡聚糖浓度大于50ng/mL。这种情况下可将样品适当稀释后再测量。

[0033] 实施例3:样品检测实例

采用实施例2的方法检测各类样品,检测结果如表1所示:

表1 各类样品的检测结果

样品	< 5ng/ml	5-20ng/ml	20-50ng/ml	> 50ng/ml	测试无效
去离子水	●				
Dextran T2000 溶液(64ng/mL)				●	
Dextran T2000 溶液(32ng/mL)			●		
Dextran T2000 溶液(16ng/mL)		●			
Dextran T2000 溶液(2ng/mL)	●				
Dextran T40 溶液(64ng/mL)				●	
Dextran T40 溶液(32ng/mL)			●		
Dextran T40 溶液(16ng/mL)		●			
Dextran T40 溶液(2ng/mL)	●				
甘蔗汁 1			●		
甘蔗汁 2			●		
甘蔗汁 3				●	
原糖 D03 溶液(1g/mL)				●	
原糖 D03 溶液稀释 1000 倍				●	
原糖 D03 溶液稀释 10,000 倍			●		
红糖溶液(1g/mL)		●			
赤砂糖 A 溶液(1g/mL)			●		
赤砂糖 B 溶液(1g/mL)			●		
葡萄糖溶液(1g/mL)	●				
淀粉溶液(1g/mL)	●				
β-葡聚糖(1g/mL)	●				

其中Dextran T2000和Dextran T40标准品溶液的测试结果符合预期。葡萄糖,淀粉,β-葡聚糖等样品不会对检测造成干扰,显示出试纸条具有较好的特异性。

[0034] 以上实施例表明,本发明的检测α-葡聚糖的金标试纸特异性强,灵敏度高,操作简单、方便、快捷,不需要特殊仪器设备和专业培训,结果明晰易辨,经济实用。

[0035] 以上实施例仅为介绍本发明的优选案例,对于本领域技术人员来说,在不背离本发明精神的范围内所进行的任何显而易见的变化和改进,都应被视为本发明的一部分。

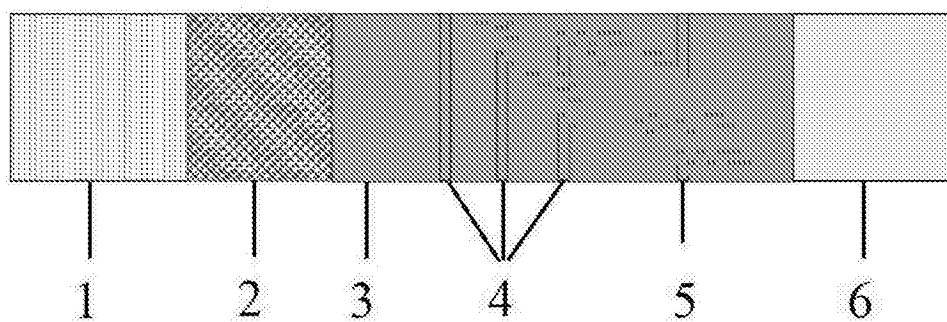


图1

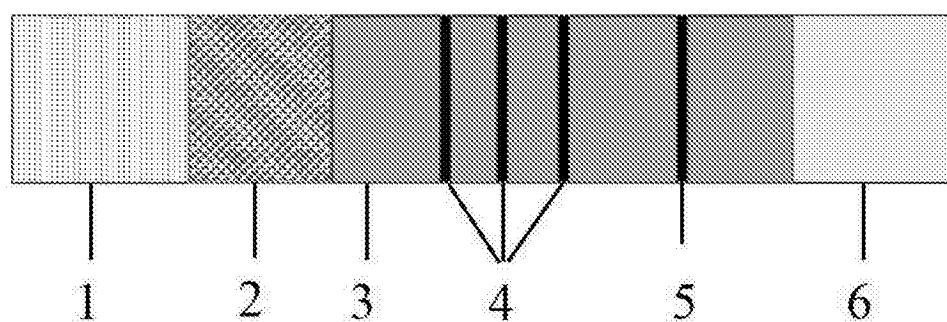


图2

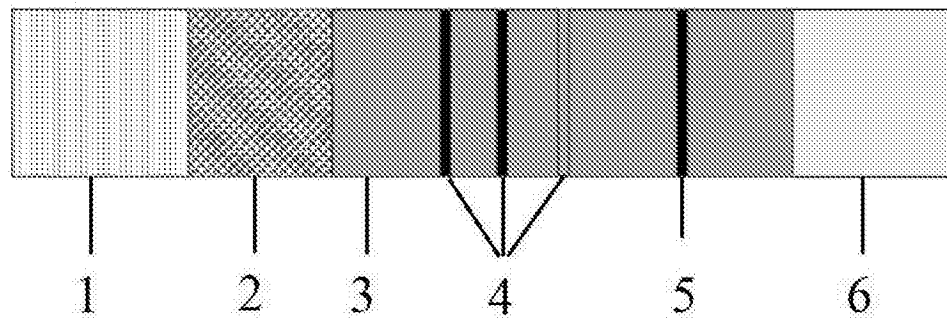


图3

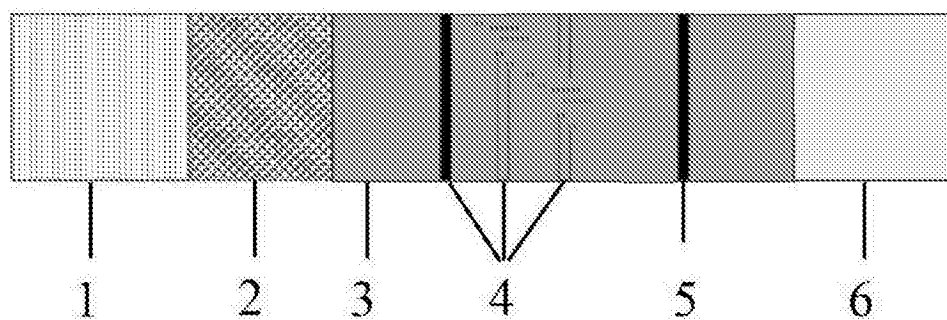


图4

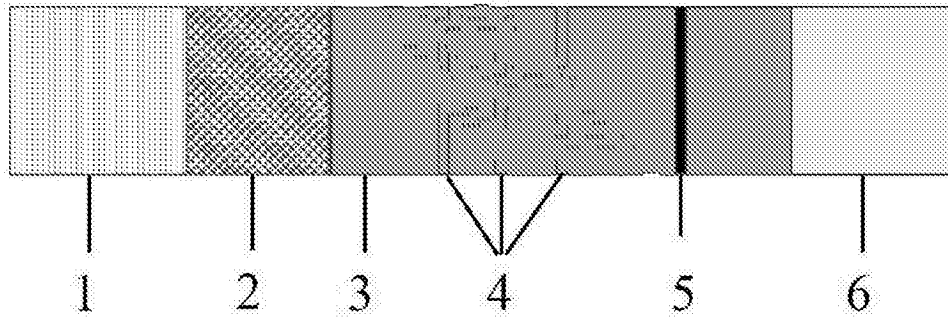


图5

专利名称(译)	检测 α -葡聚糖的金标试纸及检测方法		
公开(公告)号	CN105628917A	公开(公告)日	2016-06-01
申请号	CN201511003578.3	申请日	2015-12-25
[标]申请(专利权)人(译)	广州甘蔗糖业研究所 广西农垦糖业集团股份有限公司		
申请(专利权)人(译)	广州甘蔗糖业研究所 广西农垦糖业集团股份有限公司		
当前申请(专利权)人(译)	广州甘蔗糖业研究所 广西农垦糖业集团股份有限公司		
[标]发明人	梁达奉 曾练强 黄曾慰 马步 柳颖 常国炜		
发明人	梁达奉 曾练强 黄曾慰 马步 柳颖 常国炜		
IPC分类号	G01N33/558 G01N33/531		
CPC分类号	G01N33/558 G01N33/531		
代理人(译)	郑莹		
外部链接	Espacenet SIPO		

摘要(译)

本发明公开了一种检测 α -葡聚糖的金标试纸及检测方法，包括底板，底板上依次相连的样品垫、金标垫、硝酸纤维素膜以及吸样垫。在硝酸纤维素膜上设有检测线抗原和质控线抗体，在金标垫上设有金标抗体。根据胶体金免疫层析试验(GICA)原理制成，选取抗 α -葡聚糖特异性单克隆抗体，采用竞争抑制免疫层析测 α -葡聚糖。应用本发明试纸检测 α -葡聚糖，特异性强，灵敏度高，操作简单、方便、快捷，不需要特殊仪器设备和专业培训，结果明晰易辨，经济实用。

样品	< 5ng/ml	5-20ng/ml	20-50ng/ml	> 50ng/ml	测试无效
去离子水	●			●	
Dextran T2000 溶液(64ng/mL)			●		
Dextran T2000 溶液(32ng/mL)		●			
Dextran T2000 溶液(16ng/mL)	●				
Dextran T2000 溶液(2ng/mL)				●	
Dextran T40 溶液(64ng/mL)			●		
Dextran T40 溶液(32ng/mL)		●			
Dextran T40 溶液(16ng/mL)	●				
甘蔗汁 1			●		
甘蔗汁 2			●		
甘蔗汁 3				●	
原糖 D03 溶液(1g/mL)				●	
原糖 D03 溶液稀释 1000 倍				●	
原糖 D03 溶液稀释 10,000 倍			●		
红糖溶液(1g/mL)		●			
赤砂糖 A 溶液(1g/mL)			●		
赤砂糖 B 溶液(1g/mL)			●		
葡萄糖溶液(1g/mL)	●				
淀粉溶液(1g/mL)	●				
β -葡聚糖(1g/mL)	●				