

葡聚糖抗体的制备及其 Elisa 检测方法的建立

谢珍茗, 方丽莎, 孙明, 余林*

(广东工业大学 轻工化工学院, 广东 广州 510003)

摘要: 制备并筛选葡聚糖拟糖蛋白抗原, 通过动物免疫获得葡聚糖多克隆抗体并建立葡聚糖的 Elisa 检测方法, 应用于实际样品检测。以还原胺化法制备大分子葡聚糖-牛血清蛋白(BSA)拟糖蛋白质, 通过 SDS-PAGE 与自由氨基测定, 优化葡聚糖拟糖蛋白抗原制备反应, 建立直接竞争 Elisa 筛选抗原活性。以制得的葡聚糖 T40-BSA 拟糖蛋白抗原为免疫原, 经过免疫白兔后获得高效价多抗; 建立检测葡聚糖多抗的间接非竞争 Elisa 方法。确定拟糖蛋白抗原的最佳制备条件(n (葡聚糖)/ n (氧化剂 NaIO_4)=1/120, 偶联时间 24 h); 筛选获得不同制备条件下与标准抗体结合最强的抗原产物 T40-BSA, 动物免疫获得多抗, 优化实验条件: 以质量浓度 10 $\mu\text{g/mL}$ 的 T40-BSA 为包被抗原, 37 $^{\circ}\text{C}$ 时血清多抗和酶标多抗的反应时间均为 45 min, 质量分数 5% 小牛血清为封闭液后洗板; 建立了基于 T40-BSA 拟糖蛋白抗原的不同相对分子质量葡聚糖间接竞争 Elisa 检测方法, 并应用于对市售白糖中葡聚糖 T40 的含量检测。研究表明, 葡聚糖-BSA 拟糖蛋白抗原制备条件不同, 对其免疫活性有影响。建立的检测方法有良好的线性, 能用于实际样品中葡聚糖含量的检测。

关键词: 葡聚糖; 拟糖蛋白抗原; 制备; 抗体; 酶联免疫分析

中图分类号: Q 539 **文献标志码:** A **文章编号:** 1673—1689(2013)12—1319—08

Preparation of Dextran Antibody and Establishment of It's Elisa Immunoassay

XIE Zhen-ming, FANG Li-sha, SUN Ming, YU Lin*

(Faculty of Light and Chemical Engineering, Guangdong University of Technology, Guangzhou 510003, China)

Abstract: In this study, dextran neoglycoprotein antigens were prepared evaluated and finally obtained dextran polyclonal antibodies, and an enzyme-linked immunosorbent assay (Elisa) detection method was developed according to Elisa theory. The method was put to use for quantitative analysis of dextran in practical samples. Dextran neoglycoprotein antigens were prepared by Reductive Amination method, and were confirmed by SDS-PAGE and free amino detection. The impact factors such as different oxidation degree of dextran, the conjugate reaction time to BSA were investigated. The antigens interacted with standard antibody and were evaluated through Elisa. The immunogen was immunized with white rabbits to obtained antibody respectively. A general and broad class-specific Elisa immunoassay was developed for dextran detection. The best preparation conditions were obtained ($n_{\text{dextran}}/n_{\text{oxidant}}$ of NaIO_4 =1/120, the reaction time of 24 h), and the antigen with best

收稿日期: 2013-05-24

基金项目: 广东省教育厅产学研结合项目(2007B090400136)。

作者简介: 谢珍茗(1979—), 女, 广东韶关人, 工学博士, 讲师, 主要从事有机合成, 有机分析研究。E-mail: raretea@126.com

* 通信作者: 余林(1968—), 男, 四川成都人, 工学博士, 教授, 主要从事催化及材料合成研究。E-mail: gych@gdut.edu.cn

combination with standard was selected. The optimized conditions of assay used coating antigen at 10 $\mu\text{g/mL}$, reaction time of antibody and rabbit-anti-bovine IgG in 45 min, blocking reagents with 5% calf serum. The developed indirect competitive Elisa method was put to use for quantitative analysis of dextran T40 in commercial sugar. The different preparation condition of dextran neoglycoprotein antigen has effect on its immunocompetence. The developed Elisa detection method with good linear and accuracy was practical for dextran determination.

Keywords: dextran, neoglycoprotein antigen, preparation, antibody, ELISA

在制糖工艺流程中,由于微生物发酵引起葡萄糖聚合会产生葡聚糖,给制糖工艺和啤酒加工过程带来不良影响^[1-2],也会降低豆粕、禾谷类常用动物饲料原料中的营养成分^[3]。为实时监控、消除和控制葡聚糖的负面影响,建立一种快速、准确的葡聚糖定量检测方法十分必要。

但葡聚糖的快速定量检测还是一个难题^[4-5]。当前其检测方法包括 Haze 法、Amstar 契约法、罗伯特-铜法和 ICUMSA 法等,均是化学分析方法,具有准确度不高、操作繁琐复杂等缺点^[6-7]。免疫检测技术,根据抗体和抗原特异性结合,具有操作简单、灵敏度高、特异性强、重复性好等优点,成为葡聚糖快速检测一个很有希望的方向^[8-10]。目前国外已有部分企业采用免疫法进行生产检测^[11],但由于所需要的进口抗体相当昂贵,在国内尚无被使用的报道^[12]。

为建立葡聚糖的免疫学检测方法,研究中以还原胺化法将葡聚糖与牛血清蛋白质(BSA)偶联,通过提高葡聚糖的分支度,增加葡聚糖的相对分子质量,改变其空间结构,制备免疫原性较强的葡聚糖拟糖蛋白抗原。通过以 SDS-PAGE 蛋白质分析和自由氨基测定^[13-14],研究不同偶联反应条件对生成拟糖蛋白抗原的影响,确定最佳反应条件,并在与市售葡聚糖标准一抗的倍比稀释 ELISA 实验中^[15],测定研究不同制备条件所得抗原与标准抗体结合率,筛选具有高免疫活性的抗原。通过动物免疫获得高效价多抗,建立了快速、高效、灵敏度高的葡聚糖 T40 竞争抑制免疫学检测方法,并用于实际样品检测,为葡聚糖的免疫学快速检测试剂盒产品的开发提供理论依据和技术支持。

1 材料与方法

1.1 材料与试剂

葡聚糖 (T10, T40, T100, T2000), BSA, 购自

Sangon 公司; 标准葡聚糖一抗, Stem Cell Technologies 公司产品; 测试用标准蛋白质, 购自宝生物工程(大连)公司; 完全弗氏佐剂, 不完全弗氏佐剂, 酪蛋白质, 购自北京鼎国昌盛生物技术公司; 羊抗鼠酶标二抗, Tween 20, 四甲基联苯胺(TMB), 购自 Sigma 公司; 其他试剂均为分析纯; 超滤离心管, Millipore 公司产品。

1.2 仪器与设备

DYCZ-26B 型双向电泳仪, 北京六一仪器厂制造; LGJ-10 型冷冻干燥机, 北京四环科学仪器厂制造; T-245 型紫外可见分光光度计, 日本岛津公司制造; 1420 型荧光免疫分析仪, 芬兰 Wallacoy 公司制造; 3K-18 型冷冻离心机, 德国 BECKMAN 公司制造; MB100-4P 微孔板恒温振荡器, 杭州奥盛仪器有限公司制造; pHs-3c 型 pH 计, 上海精密科学仪器有限公司制造。

1.3 拟糖蛋白质的合成

1.3.1 氧化葡聚糖的制备 将葡聚糖 T40 与 NaIO_4 按摩尔比分别为 1/10, 1/60, 1/100, 1/120, 1/187 的比例在水溶液下避光搅拌反应 6 h 后, 加入适量的乙二醇继续搅拌 1 h, 反应后混合液在 10 kDa 超滤离心管中过滤浓缩, 制备成不同的氧化葡聚糖, 产物冷冻干燥备用。葡聚糖 T10、T100 和 T2000 按上述方法氧化, 分别得 T10、T100、T2000 的多醛基氧化葡聚糖。

1.3.2 不同接枝产物的制备 氧化葡聚糖与 BSA 偶联路线如图 1 所示。将不同氧化度的不同葡聚糖 (T10、T40、T100 和 T2000) 与等物质的量 BAS 在室温条件下的 pH 8.0 磷酸缓冲液中反应, 生成稳定的拟糖蛋白质, 产物过滤提纯。

1.4 拟糖蛋白质的表征

1.4.1 聚丙烯酰胺凝胶电泳(SDS-PAGE) 质量分数 7.5% 分离胶, 质量分数 3% 浓缩胶 (含质量分数

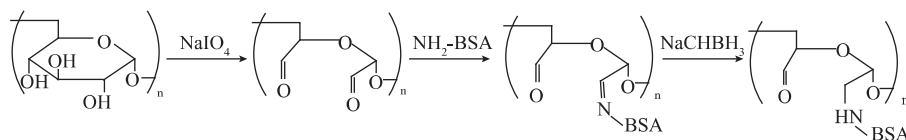


图1 葡聚糖-BSA 偶联物合成路线

Fig. 1 Schematic representation of the synthesis of dextran-BSA neoglycoprotein .

0.1% SDS),样品用Tris-HCl 缓冲液(pH 6.8)配制。电泳时间 5 h。最后用考马斯亮蓝 R250 和品红试剂分别染色^[12]。

1.4.2 自由氨基的测定 采用 OPA (邻苯二甲醛) 比色法测定拟糖蛋白质的自由氨基含量。取测定用标准 OPA 试剂 5 mL 于试管中,分别注入 20 μ L 各拟糖蛋白质样品液(空白加 20 μ L 双蒸水为参比),混匀后于 35 $^{\circ}$ C 反应 5 min,于波长 340 nm 处分别测样品与空白的吸光度(分别记为 $A_{340\text{ nm}}$ 和 A_0),二者之差 ΔA_{340} 为自由氨基的净吸光度。以赖氨酸为标准曲线,根据 ΔA_{340} 计算样品中自由氨基的数量 C_t ,并按式(1)计算拟糖蛋白质的接枝度 DG (Degree of Graft)。

$$\text{DG} = ((C_0 - C_t) / C_0) \times 100\% \quad (1)$$

式(1)中: C_0 为未反应时蛋白质自由氨基总量; C_t 为反应 t 时刻后蛋白质自由氨基的含量。

1.4.3 拟糖蛋白抗原与标准抗体结合活性的 Elisa 测定 抗原用 0.1 mol/L 碳酸盐缓冲溶液 (pH 9.6) 梯度稀释,加入酶标板孔中包被,加质量分数 5% 酪蛋白质封闭后,加标准葡聚糖一抗、羊抗鼠二抗和 TMB 底物,反应 15 min,反应溶液加 H_2SO_4 终止后,在 1420 型荧光免疫分析仪上 450 nm 波长读数。

1.5 多抗的制备与纯化

以自制 T40-BSA 拟糖蛋白抗原,免疫成年雄性新西兰白兔,制备多克隆抗体。抗原与等量完全福氏佐剂混合并充分乳化,经背部皮内多点注射,每次免疫剂量为 1 000 μ g/只。2 周后以等量不完全福氏佐剂进行第 2 次免疫,之后每隔 2 周加强免疫 1 次,3 次免疫后颈动脉插管采血,采血前 3 d,耳静脉加强免疫,剂量为 500 μ g/只。分离血清,采用饱和硫酸铵法^[15-16]纯化抗体,置 -20 $^{\circ}$ C 保存(此部分由厦门大学医学院协助完成)。

1.6 多抗的间接非竞争 Elisa 检测方法的建立与应用

用方阵滴定法对纯化后的多抗进行表征,确定抗原的包被浓度,多抗与酶标多抗作用时间,封闭

液类型及最佳抗体稀释浓度等因素,优化获得间接非竞争 Elisa 测定条件。

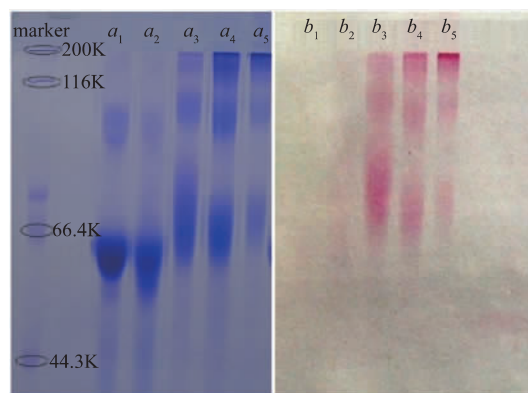
以确立的 Elisa 测定条件,制作葡聚糖 T40 的 Elisa 测定标准曲线,测定方法的半数抑制浓度 IC_{50} 和最低检测浓度。以交叉反应率 (cross reactivity, CR) 评价方法的特异性,评价不同的葡聚糖 T10, T100 和 T2000 对 T40 检测的影响,以所建立的方法对市售蔗糖中葡聚糖 T40 含量进行检测。

$$\text{交叉反应率} = (\text{T40 的 } \text{IC}_{50} / \text{其他葡聚糖的 } \text{IC}_{50}) \times 100\% \quad (2)$$

2 结果与分析

2.1 葡聚糖拟糖蛋白质的制备与表征

2.1.1 葡聚糖的不同氧化度对拟糖蛋白产物的影响 以 T40 的 BSA 拟糖蛋白质为例,通过对产物 SDS-PAGE 电泳及 DG 测定,研究葡聚糖的不同氧化度对拟糖蛋白产物的影响,结果如图 2 和图 3 所示。



a 考马斯亮蓝 R250 染色;b 过碘酸-品红染色。

1 纯 BSA; 2 (T40)/(NaIO₄)=1/10; 3 (T40)/(NaIO₄)=1/60; 4 (T40)/(NaIO₄)=1/120; 5 (T40)/(NaIO₄)=1/187。

图2 不同氧化度的 T40 制得的拟糖蛋白产物 SDS-PAGE 图

Fig. 2 SDS -PAGE of dextran -BSA neoglycoprotein prepared by different degrees of oxidation

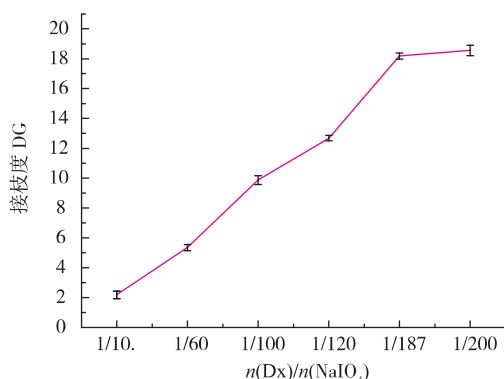


图3 不同氧化度对 T40 拟糖蛋白质接枝度的影响

Fig. 3 Effect of different degrees of oxidation on DG of dextran-BSA neoglycoprotein

从图2可以看出,随着T40氧化程度的增加,高相对分子质量的T40拟糖蛋白质不断增多,氧化剂的增加对拟糖蛋白产物的制备呈正比关系。考虑到过强氧化剂有可能会破坏葡聚糖链,进而影响拟糖蛋白抗原活性,且会消耗schiff碱还原中的 NaCNBH_3 ,有必要对偶联氧化程度进行量化。

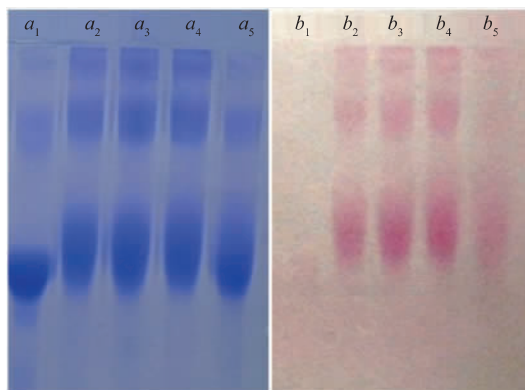
通过对不同氧化度获得的T40拟糖蛋白产物DG的测定,由图3可见,随着 $\text{T40}/\text{NaIO}_4$ 值的升高,偶联物的接枝度也明显上升,但当 $n(\text{T40})/n(\text{NaIO}_4)$ 值为1/187时,继续增加 NaIO_4 量,偶联物的接枝度并不明显上升。考虑偶联反应的需要,因此选择葡聚糖T40与 NaIO_4 的物质的量比1/120为较佳氧化条件。

2.1.2 不同偶联反应时间对拟糖蛋白产物的影响
T40的BSA拟糖蛋白质为例,通过对产物SDS-PAGE电泳及DG测定,研究不同偶联反应时间对拟糖蛋白产物的影响,结果如图4和图5所示。

从图4可以看出,反应12h就有一定的拟糖蛋白偶联物生成,继续反应到24h,48h时拟糖蛋白质的量仍有增加,但当反应进行到72h时,拟糖蛋白质的量在凝胶上反而减少,并且肉眼观察到反应72h后的偶联物溶液中有沉淀产生。

由图5可见,T40拟糖蛋白质接枝度随反应时间的增加不断增大。这与偶联物在凝胶电泳上的现象不吻合,在凝胶上72h的拟糖蛋白偶联物的量很少,但接枝度却是最高。此现象可能与拟糖蛋白质在较长反应时间会变质有关,导致在SDS-PAGE上产物量减少。而接枝度只是测得氨基的减少量,即使蛋白质变性,只要氨基的量减少接枝度就升高。所以合成的拟糖蛋白质的好坏不能单纯以接枝

度作为参考,由此综合考虑,确定24h为较佳的反应时间。



a 考马斯亮蓝 R250 染色;b 过碘酸-品红染色。

1 纯 BSA; 2 12 h; 3 24 h; 4 48 h; 5 72 h。

图4 不同反应时间制得的T40拟糖蛋白质的 SDS-PAGE
Fig. 4 SDS-PAGE of dextran-BSA neoglycoprotein prepared in different Reaction time

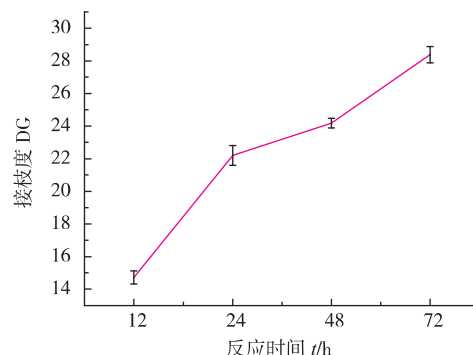


图5 反应时间对 T40 拟糖蛋白质接枝度的影响

Fig. 5 Effect of Reaction time on DG of dextran-BSA neoglycoprotein

2.2 葡聚糖拟糖蛋白抗原活性的 Elisa 测试

2.2.1 葡聚糖的不同氧化度对制得的拟糖蛋白抗原活性的影响 以T40葡聚糖为例,研究不同氧化度对制得BSA拟糖蛋白抗原活性的影响。

将T40-BSA拟糖蛋白抗原($n(\text{T40})/n(\text{NaIO}_4)=1/10$)稀释成0.5、1.0、2.5、5、10、20 $\mu\text{g/mL}$ 6个不同质量浓度进行包被,并对市售葡聚糖标准一抗进行倍比稀释Elisa试验,结果如图6所示。

从图6可见,当抗原包被量由0.5 $\mu\text{g/mL}$ 增加到2.5 $\mu\text{g/mL}$ 时,同等浓度的葡聚糖抗体条件下,OD值随包被量的增加而增大;而继续增大抗原的包被量(由2.5 $\mu\text{g/mL}$ 增大到20 $\mu\text{g/mL}$),OD值未

能继续增大。考虑到抗原和抗体的 OD 值反应二者结合反应的强弱,因此 T40-BSA 包被抗原的最适工作质量浓度为 2.5 $\mu\text{g/mL}$ 。

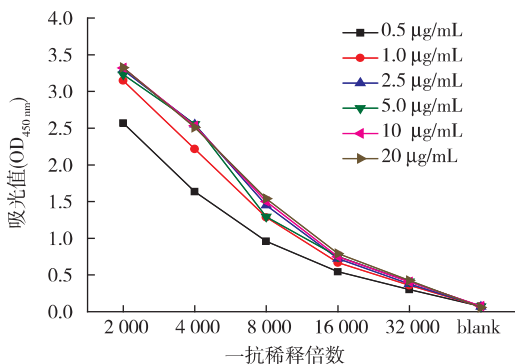
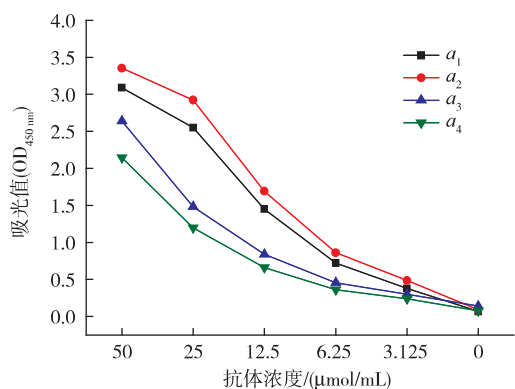


图 6 T40-BSA 拟糖蛋白抗原 ($n(\text{T40})/n(\text{NaIO}_4)=1/10$) 最佳包被浓度的确定

Fig. 6 Determination for optimal concentrations of coated antigen antigen

以此包被浓度,建立直接竞争 Elisa 实验,测定 4 个不同氧化度葡聚糖 T40 ($n(\text{T40})/n(\text{NaIO}_4)=1/10, 1/60, 1/120, 1/187$) 制得的 BSA 拟糖蛋白抗原与葡聚糖一抗的结合反应,结果如图 7 所示。



(a_1, a_2, a_3, a_4 为 $n(\text{T40})/n(\text{NaIO}_4)=1/10, 1/60, 1/120, 1/187$ 的 T40-BSA 抗原)

图 7 不同氧化度的葡聚糖 T40-BSA 抗原与标准抗体结合 OD 值

Fig. 7 OD value of different oxidized combined with dextran antibody

从图 7 可见,不同氧化度对制得的拟糖蛋白抗原活性有较大影响, $n(\text{T40})/n(\text{NaIO}_4)=1/60$ 的氧化葡聚糖-BSA 拟糖蛋白抗原与葡聚糖一抗的反应最强。氧化度太低和太高的抗原均不能和一抗很好地结合。出现这种现象的原因可能是因为当氧化度太低时,葡聚糖与 BSA 的接枝度较低,使得吸附在酶

靶板上的拟糖蛋白质上的葡聚糖很少,与葡聚糖一抗结合的特异性差;而氧化度太高时,葡聚糖原有的结构有一定的破坏,且合成的拟糖蛋白复合物分子大,形成空间障碍,妨碍酶标记二抗与已结合在固相抗原上的抗体结合,使 OD 值趋小。

2.2.2 不同反应时间对制得的拟糖蛋白抗原活性的影响 以反应 12 h 的 T40-BSA 拟糖蛋白抗原 ($n(\text{T40})/n(\text{NaIO}_4)=1/120$) 稀释成 0.5、1.0、2.5、5.0、10、20 $\mu\text{g/mL}$ 6 个不同质量浓度进行包被,与市售葡聚糖一抗进行 Elisa 试验,结果如图 8 所示。

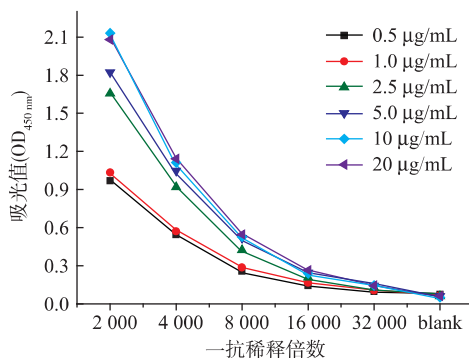
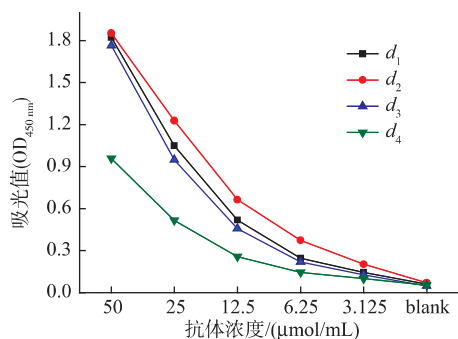


图 8 反应 12 h 的 T40-BSA 拟糖蛋白抗原最佳包被浓度的确定

Fig. 8 Determination for optimal concentrations of coated antigen react 12 h

由图 8 可见,当包被质量浓度上升到 5.0 $\mu\text{g/mL}$ 时,OD 值增加并不明显。因此反应 12 h 的 T40-BSA 包被抗原 ($n(\text{T40})/n(\text{NaIO}_4)=1/120$) 的最适工作质量浓度为 10 $\mu\text{g/mL}$ 。

图 9 是在此包被浓度下,不同反应时间(12、24、48、72 h) T40-BSA 包被抗原 ($n(\text{T40})/n(\text{NaIO}_4)=1/120$) 与葡聚糖一抗进行的 Elisa 试验。



(d_1, d_2, d_3, d_4 分别为反应 12、24、48、72 h 的 T40-BSA 抗原)

图 9 不同反应时间 T40-BSA 抗原与标准抗体结合 OD 值

Fig. 9 OD value of different reaction time antigen combined with dextran antibody

由图 9 可见,BSA 与氧化葡聚糖反应 24 h 时的抗原与葡聚糖一抗的结合最强。这与 SDS-PAGE 的结果相应,当反应 24 h 后抗原的接枝度增加不明显,并且有变性现象。

2.2.3 不同相对分子质量的葡聚糖对制得的拟糖蛋白抗原活性的影响 图 10 是 BSA 与不同相对分子质量的葡聚糖 (T10、T40、T100、T2000, $n(\text{dex})/n(\text{NaIO}_4)=1/120$, 反应 24 h) 在 $10 \mu\text{g/mL}$ 的抗原包被质量浓度下与葡聚糖一抗进行的 Elisa 试验。

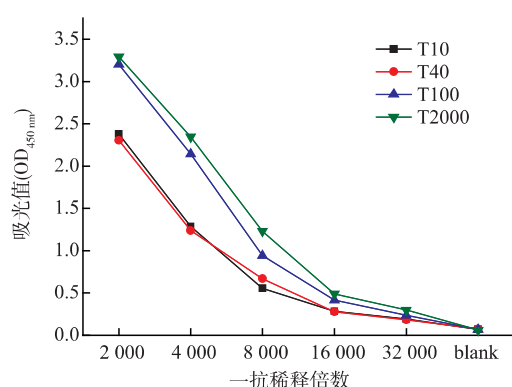


图 10 不同葡聚糖-BSA 抗原与葡聚糖一抗结合 OD 值
Fig. 10 OD value of different dextran antigen combined with standard dextran antibody

由图 10 可见,相对分子质量大的氧化葡聚糖 (T2000 和 T100) 比相对分子质量较小的 (T40 和 T10) 与 BSA 偶联的拟糖蛋白抗原,与标准葡聚糖一抗的结合较强。此结论与作者实验前预想的,大相对分子质量的葡聚糖抗原,尤其是 100~200 kD 的高分子组分,其生物活性较强是符合的。为进一步改变葡聚糖的空间结构,认识拟糖蛋白抗原在生物体内的生理生化反应,达到增强免疫原性提供了理论依据。

2.3 多抗的间接非竞争 Elisa 检测方法优化

委托厦门大学医学院依据 1.3 制备并纯化获得葡聚糖 T40-BSA 抗体,建立间接非竞争 Elisa 方法表征多抗。

2.3.1 包被抗原浓度的确定 以 T40-BSA 拟糖蛋白抗原 ($n(\text{T40})/n(\text{NaIO}_4)=1/120$) 稀释成 2.5、5、10 $\mu\text{g/mL}$ 和 20 $\mu\text{g/mL}$ 4 个不同质量浓度进行包被,并对葡聚糖多抗血清进行倍比稀释进行 Elisa 试验,结果如图 11 所示。

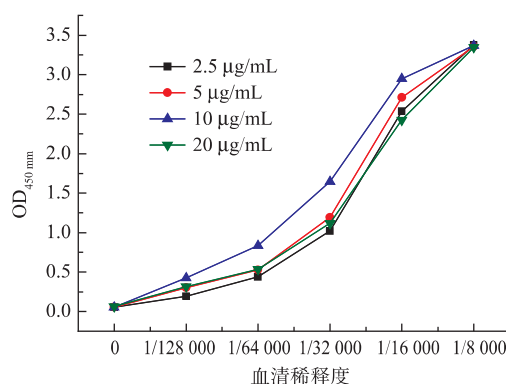


图 11 抗原最适包被浓度的确定
Fig. 11 Determination for optimal concentrations of coated antigen

从图 11 可见,当抗原包被量由 2.5 $\mu\text{g/mL}$ 增加到 10 $\mu\text{g/mL}$ 时,同等浓度的葡聚糖抗体条件下,OD₄₅₀ 值随包被量的增加而增大;但再继续增大抗原的包被量(由 10 $\mu\text{g/mL}$ 增大到 20 $\mu\text{g/mL}$)并不能使 OD₄₅₀ 值增大。由此确定葡聚糖 T40-BSA 包被抗原的最适工作质量浓度为 10 $\mu\text{g/mL}$ 。

2.3.2 血清多抗和酶标多抗作用时间的确定 在 37 $^{\circ}\text{C}$ 条件下,血清多抗与酶标多抗反应时间对检测的影响曲线如图 12 所示。

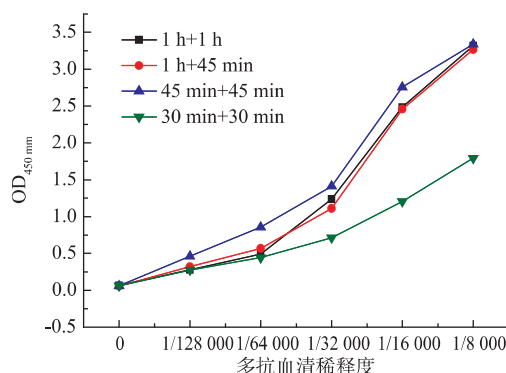


图 12 血清多抗和酶标多抗最佳作用时间的确定
Fig. 12 Determination for optimal time of serum and rabbit-anti-bovine IgG

从图 12 可以看出,当封闭后分别与血清多抗作用 45 min 和酶标多抗作用 45 min 时,整体反应的 OD₄₅₀ 值最高,因此确定血清多抗和酶标多抗的最佳反应时间均为 45 min。

2.3.3 封闭液的选择 实验中分别考察了质量分数 5% 小牛血清和质量分数 5% 酪蛋白这两种封闭液,并对比其在封闭完成后,洗板和直接拍干板不洗两种清洗方式对 Elisa 检测的影响,见图 13。

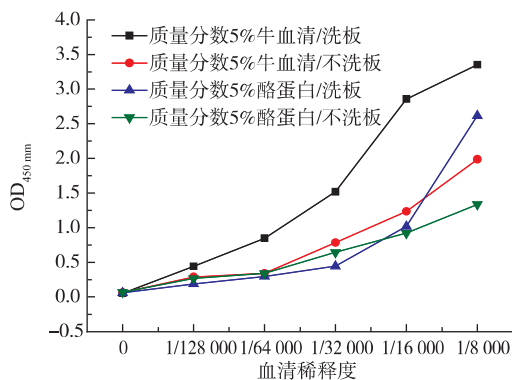


图 13 最佳封闭液的确定

Fig. 13 Determination for optimal blocking reagents

从图 13 可看出,质量分数 5%小牛血清封闭液并且洗板的方式能获得最佳的 OD₄₅₀ 值,因此确定质量分数 5%小牛血清为封闭液,并且封闭完洗板。

2.3.4 最佳血清抗体稀释度的确定 以上确定的包被质量浓度 10 μg/mL、反应时间和封闭液,加入葡聚糖 T40 为竞争物,建立间接竞争 Elisa 检测方法。从上图 6 可以看出,竞争物 T40 抑制质量浓度从 0.5 μg/mL 到 128 μg/mL,多抗血清稀释度分别为 1/8 000、1/16 000 和 1/32 000,都能有效抑制葡聚糖 T40,而最佳稀释倍数为 1/32 000。

2.4 间接竞争 Elisa 检测方法的建立

2.4.1 多抗血清竞争 Elisa 的建立 依据检测抗原和多抗用量少的原则,兼顾方法的灵敏性,选择以 10 μg/mL 的 T40-BSA 抗原包被,抗体稀释度为 1/32 000,优化葡聚糖 T40 的间接 Elisa 标准曲线如图 14 之 (3) 所示。该曲线的回归方程为 $Y=1.0969-0.52027 \cdot \log(X)$ ($r^2=9.796$), IC₅₀ 为 32 ng/mL,此方法在 0.5~128 ng/mL 质量浓度范围内具有良好线性,最低检测限 (LOD) 为 0.5 ng/mL,表明方法具有较好的灵敏度。

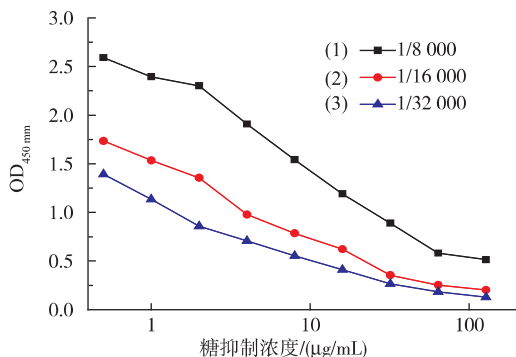


图 14 最佳血清抗体稀释度的确定

Fig. 14 Determination of the optimal dilution of serum

2.4.2 特异性分析 以不同浓度的葡聚糖抗原 (T10, T100 和 T2000) 替代 T40 抗原包被,设立阳性对照,按竞争 Elisa 进行测定,建立葡聚糖抑制工作曲线,见图 15,分别得到各自的抑制浓度 IC₅₀,计算得到交叉反应率,结果列于表 1。

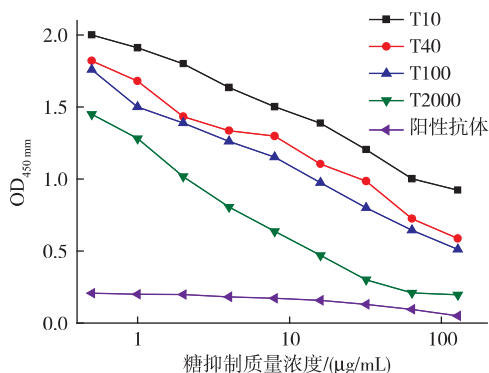


图 15 不同相对分子质量糖的抑制效果

Fig. 15 Inhibitory effect of different dextran

表 1 不同葡聚糖的间接竞争 Elisa 标准曲线

Table 1 Indirect competitive Elisa standard curve for different dextran

葡聚糖	IC ₅₀ /(mg/L)	交叉反应率/%
T10	48	150
T100	8	25
T2000	4	12.5
阳性抗体	0	0

从图 15 可见,大相对分子质量的葡聚糖均能对多抗血清产生抑制作用,且相对分子质量越大的葡聚糖对多抗的抑制效果更明显。从交叉反应率可见,不同相对分子质量葡聚糖对 T40 的检测均有交叉,且葡聚糖相对分子质量越小,交叉越明显。但考虑到不同相对分子质量葡聚糖的影响是类似的,此方法虽然对葡聚糖 T40 含量测定特异性不高,但对样品中的葡聚糖总体含量测定是适用的。

2.3 竞争 Elisa 方法的应用

以作者建立的方法对市售白糖中葡聚糖含量进行检测,图 16 是市售白糖对 T40-BSA 多抗血清的抑制曲线。由图 16 可见,市售白糖质量浓度从 30 μg/mL 到 0.4 μg/mL 时,糖抑制明显,即白糖含有一定的葡聚糖 T40。由此可确定当白糖含量达到 0.4 μg/mL 以上时,能被此多抗检出。根据糖竞争抑制曲线可准确定量换算出样品葡聚糖含量。当抑制率为 50% 时,白糖的质量浓度为 25 μg/mL,葡聚

糖 T40 质量浓度为 $3.5 \mu\text{g/mL}$, 即相当于白糖中葡聚糖 T40 的质量浓度为 $3.5 \mu\text{g/mL}$ 。

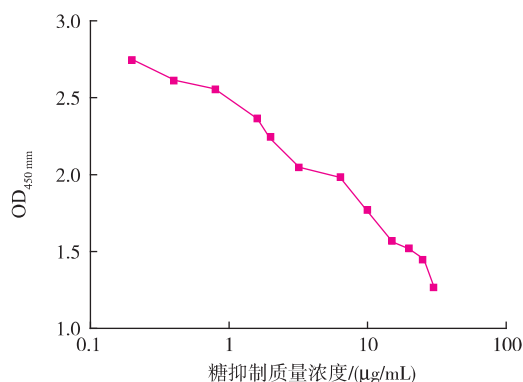


图 16 市售白糖的抑制效果

Fig. 16 Inhibitory effect of sugar

3 结语

以还原胺化法制备葡聚糖-BSA 拟糖蛋白抗原,通过制备条件优化,得出在葡聚糖/氧化剂 NaIO_4 为 1/120,偶联时间 24 h 是适宜的制备条件;建立直接竞争 Elisa 研究制备的抗原与市售葡聚糖一抗的结合率。结果表明,偶联反应时葡聚糖的种类,葡聚糖的不同氧化程度及不同偶联反应时间制得的抗原与标准抗体的结合程度不同,通过此法筛选具有较强的抗体免疫应答的拟糖蛋白抗原。

以制备的 T40-BSA 抗原,免疫白兔后可获得高效价的抗体。建立了检测葡聚糖 T40 含量的间接非竞争 Elisa 方法,研究了方法的灵敏度和特异性,并以此法运用于市售白糖中 T40 含量的检测。

参考文献:

- [1] Abdel-Rahman E A, Smejkal Q, Schick R, et al. Influence of dextran concentrations and molecular fractions on the rate of sucrose crystallization in pure sucrose solutions[J]. *Journal of Food Engineering*, 2008, 84: 501-508.
- [2] Chung C C. Handbook of Sugar Refining[M]. New York: John Wiley & Sons Inc, 2000: 516-517.
- [3] 宋少云, 廖威. 葡聚糖的研究进展[J]. 中山大学学报: 自然科学版, 2005, 44(2): 229-232.
SONG Shao-yun, LIAO Wei. A Review on Glucan [J]. *Acta Scientiarum Naturalium Universitatis Sunyatsen*, 2005, 44(2): 229-232. (in Chinese)
- [4] Singleton V. A new polarimetric method for the analysis of dextran and sucrose[J]. *Sugar industry Technol*, 2001: 227-232.
- [5] Clarke M A, Godshall M A. Determination of dextrans in raw cane sugar by Roberts copper method: Collaborative study[J]. *J Assoc Off Anal Chem*, 1988, 71(2): 276-279.
- [6] 吴飒丽. 蔗汁中葡聚糖的测定及葡聚糖含量的变化特性研究[D]. 南宁: 广西大学, 2007.
- [7] 梁达奉, 曾练强, 郭亭, 等. 葡聚糖对制糖工业的影响及对策(上)[J]. 甘蔗糖业, 2008(3): 28-33.
LIANG Da-feng, ZENG Lian-qiang, GUO Ting, et al. The influence and countermeasure of dextran to sugar industry [J]. *Sugarcane and Canesuga*, 2008(3): 28-33. (in Chinese)
- [8] Shavej A, Richard F Tester, Alistair Corbett, et al. Dextran and 5-aminosalicylic acid (5-ASA) conjugates: synthesis, characterization and enzymic hydrolysis[J]. *Carbohydrate Research*, 2006, 34: 2694-2701.
- [9] Walaisiri M, Lee E Kirsch. The protein-binding and drug release properties of macromolecular conjugates containing daptomycin and dextran[J]. *International Journal of Pharmaceutics*, 2006, 315: 30-43.
- [10] Yoann M C, René R. Chapter 6-Design and creativity in synthesis of multivalent neoglycoconjugates [J]. *Carbohydrate Chemistry and Biochemistry*, 2010, 63: 165.
- [11] Day D F, Cuddihy J A, Rauh J S. Versatility of the antibody dextran test method[J]. *Amelia Island Plantation*, 2002(6): 26-28.
- [12] 方丽莎, 谢珍茗, 梁达奉, 等. 人血清蛋白-葡聚糖偶合抗原的制备与表征[J]. 食品科学, 2010(3): 187-191.
FANG Li-sha, XIE Zhen-ming, LIANG Da-feng, et al. Preparation and characterization of conjugated antigen between human serum albumin and dextrans[J]. *Food Science*, 2010(3): 187-191. (in Chinese)
- [13] Carline M J Brands, Martinus A J S van Boekel. Kinetic modelling of reactions in heated disaccharide-casein systems[J]. *Food Chemistry*, 2003, 83: 13-26.
- [14] 刘燕, 裴爱泳. 大豆蛋白与多糖的接枝改性[J]. 中国油脂, 2006, 31(1): 39-41.
LIU Yan, QIU Ai-yong. Modification of soy protein by graft with polysaccharide[J]. *China Oil and Fats*, 2006, 31(1): 39-41. (in Chinese)
- [15] Christophe A Marquette, Pauline Hezard, Agnes Degiuli, et al. Macro-molecular chemiluminescent complex for enhanced immuno-detection onto microtiter plate and protein biochip[J]. *Sensors and Actuators*, 2006, 113: 664-670.