



天津科技大学学报

Journal of Tianjin University of Science & Technology

ISSN 1672-6510, CN 12-1355/N

《天津科技大学学报》网络首发论文

题目: 真菌 β -1, 3-D-葡聚糖标准品的制备及分析
作者: 翟栓柱, 邵迎, 王钰, 钟成
DOI: 10.13364/j.issn.1672-6510.20250164
收稿日期: 2025-10-29
网络首发日期: 2026-07-09
引用格式: 翟栓柱, 邵迎, 王钰, 钟成. 真菌 β -1, 3-D-葡聚糖标准品的制备及分析[J/OL]. 天津科技大学学报. <https://doi.org/10.13364/j.issn.1672-6510.20250164>



网络首发: 在编辑部工作流程中, 稿件从录用到出版要经历录用定稿、排版定稿、整期汇编定稿等阶段。录用定稿指内容已经确定, 且通过同行评议、主编终审同意刊用的稿件。排版定稿指录用定稿按照期刊特定版式(包括网络呈现版式)排版后的稿件, 可暂不确定出版年、卷、期和页码。整期汇编定稿指出版年、卷、期、页码均已确定的印刷或数字出版的整期汇编稿件。录用定稿网络首发稿件内容必须符合《出版管理条例》和《期刊出版管理规定》的有关规定; 学术研究成果具有创新性、科学性和先进性, 符合编辑部对刊文的录用要求, 不存在学术不端行为及其他侵权行为; 稿件内容应基本符合国家有关书刊编辑、出版的技术标准, 正确使用和统一规范语言文字、符号、数字、外文字母、法定计量单位及地图标注等。为确保录用定稿网络首发的严肃性, 录用定稿一经发布, 不得修改论文题目、作者、机构名称和学术内容, 只可基于编辑规范进行少量文字的修改。

出版确认: 纸质期刊编辑部通过与《中国学术期刊(光盘版)》电子杂志社有限公司签约, 在《中国学术期刊(网络版)》出版传播平台上创办与纸质期刊内容一致的网络版, 以单篇或整期出版形式, 在印刷出版之前刊发论文的录用定稿、排版定稿、整期汇编定稿。因为《中国学术期刊(网络版)》是国家新闻出版广电总局批准的网络连续型出版物(ISSN 2096-4188, CN 11-6037/Z), 所以签约期刊的网络版上网络首发论文视为正式出版。



DOI: 10.13364/j.issn.1672-6510.20250164

真菌 β -1,3-*D*-葡聚糖标准品的制备及分析

翟栓柱^{1,2}, 邵迎^{3,4}, 王钰², 钟成¹

(1. 天津科技大学生物工程学院, 天津 300457; 2. 丹娜(天津)生物科技股份有限公司, 天津 300467;
3. 天津大学合成生物学国家重点实验室, 天津 300072; 4. 天津大学合成生物与生物制造学院, 天津 300072)

摘要: 在侵袭性真菌病的早期诊断中, β -1,3-*D*-葡聚糖检测(G 试验)的标准品存在水溶性、均匀性差的问题, 影响检测的准确性。本研究通过提取茯苓(*Poria cocos*) β -1,3-*D*-葡聚糖, 羧甲基化修饰成羧甲基茯苓葡聚糖(carboxymethyl *Poria cocos* β -1,3-*D*-glucan, CPG), 分析其结构, 并验证 CPG 标准品的溯源性、不确定度、稳定性等性能。结果显示, CPG 总糖含量达 $(91.10 \pm 2.16)\%$, 主要为以 $\rightarrow 3$)- β -GlcP-(1 $\rightarrow$ 连接的葡聚糖。CPG 的红外光谱分析中 1420 cm^{-1} 处的伸缩振动峰、核磁共振(NMR)分析中 C1 在 $\delta\ 102.43\text{ ppm}$ 处的信号, 以及 CPG 水溶性较羧甲基化之前提升 12.6 倍等结果均表明 CPG 羧甲基化修饰成功。CPG 的不确定度低, 为 4.83 pg/mL , 回收率接近 100%。并且具有良好的稳定性。CPG 具备作为 G 试验标准品的核心特性, 为侵袭性真菌感染精准诊断提供可靠物质基础。

关键词: 真菌; β -1,3-*D*-葡聚糖; 羧甲基化; 结构解析; 诊断标准品

中图分类号: Q939.97 文献标志码: A 文章编号: 1672-6510 (0000)00-0000-00

Preparation and Analysis of Fungal β -1,3-*D*-Glucan Standard

ZHAI Shuanzhu^{1,2}, SHAO Ying^{3,4}, WANG Yu², ZHONG Cheng¹

(1. College of Biotechnology, Tianjin University of Science and Technology, Tianjin 300457, China; 2. Dynamiker Biotechnology (Tianjin) Co., Ltd., Tianjin 300467, China; 3. State Key Laboratory of Synthetic Biology, Tianjin University, Tianjin 300072; 4. School of Synthetic Biology and Biomanufacturing, Tianjin University, Tianjin 300072, China)

Abstract: In the diagnosis of invasive fungal infections, the standard reference material for the β -1,3-*D*-glucan assay (G-test) suffers from poor water solubility and homogeneity, which affects the accuracy of detection. In this study, β -1,3-*D*-glucan was extracted from *Poria cocos*, and modified to obtain carboxymethyl *Poria cocos* β -1,3-*D*-glucan (CPG). The structure of the carboxymethylated product was analyzed, and the traceability, uncertainty, stability, and performance of the CPG standard reference material were verified. The results showed that the total sugar content of CPG reached $(91.10 \pm 2.16)\%$, and it was mainly composed of glucan linked by $\rightarrow 3$)- β -GlcP-(1 $\rightarrow$. The infrared spectroscopic analysis of CPG revealed a stretching vibration peak at 1420 cm^{-1} , while nuclear magnetic resonance (NMR) analysis showed a signal of C1 at $\delta 102.43\text{ ppm}$. Additionally, the water solubility of CPG was 12.6 times higher compared to before carboxymethylation. All these results confirmed the successful carboxymethylation modification of CPG. The CPG exhibited low uncertainty (4.83 pg/mL) and a recovery rate close to 100%, along with good stability. In conclusion, CPG possesses the core characteristics required for a G-test standard reference material, providing a reliable material basis for the accurate diagnosis of invasive fungal infections.

收稿日期: 2025-10-29; 修回日期: 2025-12-15

基金项目: 天津市科技重大专项与工程(ZXZSS00800)

作者简介: 翟栓柱(1989—), 男, 河南开封人, 高级工程师; 通信作者: 钟成, 教授, czhong@tust.edu.cn

Key words: fungus; β -1,3-*D*-glucan; carboxymethylation; structural analysis; diagnostic standard

侵袭性真菌感染具有早期症状不典型、致死率高的特点,早期、快速诊断是侵袭性真菌感染患者得到有效治疗和降低死亡率的关键^[1]。目前被欧洲癌症研究治疗组织及真菌研究组织(EORTC/MSG)认定的可作为真菌感染的微生物学依据的新的诊断技术为 β -1,3-*D*-葡聚糖检测(G 试验),其诊断的真菌种类较为广泛,可用于除接合菌和隐球菌属外的大部分真菌感染的辅助诊断^[2]。真菌细胞壁的 β -1,3-*D*-葡聚糖激活试剂 G 因子后引发酶促级联反应,根据动态检测溶液的吸光度变化率对 β -1,3-*D*-葡聚糖浓度进行定量或半定量测定,这其中需要标准品或者质控品判断此次试验的准确性。但是对于 G 试验,目前并未有统一的国际/国家标准品,生产商多使用茯苓多糖、香菇多糖、昆布多糖等葡聚糖进行生产。此类多糖为碱性多糖,存在水溶性差、均匀性差、纯度低的问题,一方面生产过程中可能出现瓶间差、批间差的问题,导致理论浓度与实际浓度存在误差,对于临床样本的定量与半定量检测存在影响;另一方面,对于不同方法学的真菌检测产品的正确度、准确性也会造成误差,这些误差最终均会反映到临床诊断上,对患者的病情产生不利影响。

葡聚糖是一类由葡萄糖通过 β -糖苷键连接形成的线性或分支多糖,广泛存在于真菌、酵母和植物中。茯苓多糖主要为 β -(1 $\rightarrow$ 3)-*D*-葡聚糖,含少量 β -(1 $\rightarrow$ 6)糖苷侧链^[3-5]。溶解性是多糖应用时需要考虑的必要因素,通过化学改性,如羧甲基化、磷酸化、硫酸化修饰,能够有效提高其溶解性,从而提高其活性^[6]。目前许多学者或者厂商通过多糖的结构化修饰提高溶解性^[7]。在诸多化学改性中,羧甲基化是一种广泛、经济且操作便捷的方法。羧甲基化修饰是指将羧甲基基团引入多糖分子链上的反应,修饰后的多糖理化性质和组成结构发生了改变,其活性也发生了改变^[8]。羧甲基化茯苓多糖具有抗肿瘤、抗凝剂、抗氧化的活性^[9],但是对于羧甲基化真菌多糖用于体外诊断试剂的研究较少。

本研究首先进行茯苓 β -1,3-*D*-葡聚糖(*Poria cocos* β -1,3-*D*-glucan, PG)的分离纯化,再将 PG 羧甲基化(Carboxymethylated *Poria cocos* β -1,3-*D*-glucan, CPG),增加其溶解度和均一性。与其他改性方法对比,羧甲基化反应条件温和,避免硫酸化、磷酸化的剧烈反应导致主链断裂;产物生物相

容性好,羧甲基基团无免疫原性,不干扰试剂 G 因子激活;成本低,适合规模化生产。通过检测 CPG 中总糖、糖醛酸和蛋白质含量,并对其进行单糖组成分析,对 CPG 的化学组成进行分析。随后,通过甲基化分析、分子量及分子构型分析、红外光谱及核磁共振(NMR)对 CPG 的结构进行解析,测定羧甲基化前后的溶解性差异。最后,对 CPG 标准品的性能和稳定性进行分析,验证其作为 G 实验标准品的核心特性与质量保障。

1 材料与方法

1.1 原料、试剂与仪器

茯苓(*Poria cocos*),甘肃聚和泰电子商务有限公司;无水乙醇、三氟乙酸(TFA)、二氯甲烷、冰乙酸、二甲亚砜(DMSO)、苯酚、氯乙酸,天津市江天化工技术股份有限公司;氢氧化钠、浓盐酸、浓硫酸、甲醇、异丙醇、溴化钾、硝酸钠,国药集团化学试剂有限公司;葡萄糖标准溶液、葡萄糖醛酸标准品、考马斯亮蓝、单糖(葡萄糖、木糖、半乳糖、半乳糖醛酸、葡萄糖醛酸、甘露糖、阿拉伯糖、鼠李糖)标准品,西格玛奥德里奇(上海)贸易有限公司;截留分子量 1×10^5 透析袋,北京索莱宝科技有限公司;重水(D₂O)、碘甲烷,安徽泽升科技有限公司;间羟基联苯试剂,上海迈瑞尔生化科技有限公司;牛血清白蛋白(BSA)标准溶液,生工生物工程(上海)股份有限公司;Fungitell 检测试剂盒,科德角国际生物医学科技(北京)有限公司; β -1,3-*D*-葡聚糖检测试剂盒(G 试剂盒),丹娜(天津)生物科技股份有限公司实验所用的样本来自天津市胸科医院,所有样本的信息均进行匿名处理且通过伦理委员会审查(批件号为2018KY-009-01)。

ICS-5000+型离子色谱仪,美国戴安公司;LC-20A 型高效凝胶排阻色谱,日本岛津公司;IS50 型傅里叶变换红外光谱仪,尼高利公司;Agilent 6890N 型气质联用仪,安捷伦科技有限公司;UltiMate3000 型高效液相色谱仪,赛默飞世尔科技公司;OPTILAB T-rex 型示差检测器、DAWN HELEOS-II型激光光散射检测器,怀亚特(长春)科技有限公司;AVANCE NEO 600M 型核磁共振波谱仪,德国 Bruker 公司;Infinite 200 Pro 型酶标仪,瑞士

TECAN 公司;高速大容量冷冻离心机,湘仪离心机仪器有限公司。

1.2 PG 的提取与纯化

参考罗卓雅等^[10]的方法并略作修改,对 PG 进行初步提取。称取 50 g 过筛的茯苓粉末,将其加入 1 L 无水乙醇,敞口放入通风橱 5~6 h,用热水洗涤除去脂质。用 0.5 L 0.8 mol/L NaOH (pH 12) 溶解,搅拌 4~6 h,8000 r/min 离心 10 min,取上清液。重复上述步骤提取 2 次。用 2 mol/L HCl 溶液调节 pH=7.0,得到茯苓粗糖。用截留量分子量 1×10^5 的透析袋透析 3 d,室温下调节转速为 100 r/min,每 4 h 更换一次透析液,获得茯苓多糖悬浮液。在茯苓多糖悬浮液中加入一定量的蛋白酶 K,50 °C 反应 1.5 h,煮沸灭酶,将沉淀反复水洗。随后进行透析,室温下调节转速为 100 r/min,每 4 h 更换一次透析液,透析 3 d 后冷冻干燥,得到 PG。

1.3 PG 的羧甲基化

准确称取 0.50 g PG,加入 40 mL 20% NaOH 溶液,室温搅拌 30 min 使 PG 充分溶胀;缓慢滴加 15 mL 含 20% 氯乙酸的异丙醇溶液,50 °C 恒温水浴反应 5 h (转速 200 r/min)。反应液冷却至室温,用 2 mol/L HCl 溶液调节 pH=7.0,加入 3 倍体积无水乙醇醇沉 (4 °C 静置 12 h),8000g 离心 15 min,收集沉淀。随后进行二次纯化:沉淀用去离子水重悬,经截留量分子量 1×10^5 的透析袋透析 (方法与 1.2 节相同),冷冻干燥后获得 CPG 粉末。

参考 Wang 等^[9]的电位滴定法对 CPG 进行羧甲基化程度 (即取代度 D_s) 测定。称取 0.10 g CPG,加入 50 mL 去离子水溶解,用 0.01 mol/L NaOH 标准溶液滴定至 pH=8.3,记录消耗体积 V_1 ;再加入 10 mL 0.1 mol/L HCl,搅拌 30 min 后,用 0.01 mol/L NaOH 标准溶液滴定至 pH=8.3,记录消耗体积 V_2 ;按照式 (1) 计算羧甲基化程度。

$$D_s = (0.162 \times c \times V_2) / (1 - 0.058 \times c \times V_2) \quad (1)$$

式中: c 为 NaOH 标准溶液浓度, mol/L; 0.162 为葡萄糖残基摩尔质量, kg/mol; 0.058 为羧甲基基团 ($-\text{CH}_2\text{COOH}$) 摩尔质量与葡萄糖残基摩尔质量差值, kg/mol。

1.4 CPG 化学组成分析

1.4.1 总糖含量的测定

采用苯酚-硫酸法对获得的 CPG 进行总糖含量测定^[11]。将葡萄糖标准溶液与纯净水分别按照 0 : 1、1

: 4、2 : 3、3 : 2、4 : 1、1 : 0 进行混合,获得标准曲线。分别向不同烧杯中加入 2 mL 去离子水,分别加入 15 μ L PG 悬浮液和上述不同葡萄糖浓度的溶液,充分混匀后加入 50 μ L 苯酚和 5 mL 浓硫酸,反应 5~10 min。检测以上样本在 490 nm 处的吸光度,通过标准曲线方程计算 CPG 的总糖含量。

1.4.2 糖醛酸含量的测定

采用间羟基联苯法测定糖醛酸^[12]。称取一定量的间羟基联苯,用 0.5% NaOH 溶液溶解并定容,使得间羟基联苯质量分数为 0.1%。准确称取干燥的葡萄糖醛酸标准品,并将其配制成 50、100、150、200、250 μ g/mL 标准溶液。分别取 1 mL CPG 悬浮液和标准溶液,缓慢加入 6.0 mL 浓硫酸,在冰水浴中冷却;再向各试管中加入 0.2 mL 间羟基联苯试剂,置于 30 °C 恒温水浴锅中保温 20 min。以去离子水为对照,检测 520 nm 处的吸光度。

1.4.3 蛋白质含量测定

采用考马斯亮蓝法测定蛋白质含量^[13]。取 BSA 标准溶液配制成 0、200、400、600、800、1000 μ g/mL 溶液。称取 5 mg 冻干的 CPG,加入 5 mL 去离子水,充分溶解。取 100 μ g 标准溶液或待测样品,分别加入 5 mL 考马斯亮蓝溶液,摇匀并静置 2 min,用比色皿测定 595 nm 处的吸光度。根据标准溶液浓度与吸光度的关系换算 CPG 中蛋白含量。

1.4.4 单糖组成测定

采用高效阴离子交换色谱-脉冲安培检测器分析样品的单糖组成^[14]。准确称取 1.5 mg 冻干态 CPG 样品于安瓿瓶中,加入 1.5 mL TFA,封口后将样品在 120 °C 水解 3 h。待水解完全后将样品取出,放入 2 mL 离心管中,用真空离心浓缩器 55 °C 干燥水解液。向干燥后的样品分多次加入共 0.5 mL 甲醇,以完全去除样品中的 TFA。将样品完全溶解于 1.5 mL 超纯水中进行单糖组成测试。制备 5 μ g/mL 单糖标准品 (葡萄糖、木糖、半乳糖、半乳糖醛酸、葡萄糖醛酸、甘露糖、阿拉伯糖、鼠李糖),样品用超滤管超滤后进行稀释,CPG 进样质量浓度为 40 mg/L,其他样品为 20 mg/L。采用高效阴离子交换色谱-脉冲安培检测器进行分析。

1.5 CPG 的结构验证

1.5.1 甲基化分析

参考 Xu 等^[15]的方法并略作修改。称取 10 mg CPG 并溶解于 2 mL 无水二甲基亚砜中,在 60 °C 超

声水浴中搅拌 1 h 至完全溶解^[13]。向样品中加入 1 mL 含有 20 mg/mL 碘甲烷的 NaOH 溶液, 室温下反应 3 h, 使羟基上的自由氢被甲基取代; 之后, 加入 1 mL 蒸馏水终止反应, 加入 1 mL 三氯甲烷涡旋混匀; 离心后弃去水相, 重复此操作 3~4 次; 加入 0.5 mL 4 mol/L TFA, 在 100 °C 油浴中水解甲基化样品 6 h。通过连续氮气流蒸发 TFA, 随后用 3 mg 硼代乙酰胺钠还原水解后的样品。水解还原后的样品先用 5% 乙酸甲醇溶液洗涤, 再用甲醇除去剩余的硼酸, 然后加入 0.5 mL 乙酸酐, 100 °C 加热 2 h, 使新释放的羟基上的氢全部被乙酰基取代, 未反应的乙酸酐在氮气下蒸发。所得部分甲基化的 CPG 重新溶解于二氯甲烷中。使用气相色谱-质谱 (GC-MS) 对所得产物进行分析。将样品注入带有 TG-200MS 毛细管柱 (30 m × 0.25 mm × 0.25 μm) 的 THERMO 1310 GC-ISQ LT MS 型 GC-MS 系统中。程序升温: 160~210 °C, 2 °C/min; 210~240 °C, 5 °C/min, 保持 20 min。 m/z 为 35~400。

1.5.2 平均分子量与分子构型分析

参考 Zheng 等^[16]的方法对 CPG 分子量及分子构型进行分析。将样品溶解在 0.1 mol/L NaNO₃ 水溶液 (含质量分数 0.02% NaN₃) 中, 最终质量浓度为 1 mg/mL, 用 0.45 μm 过滤器过滤后上机检测。采用凝胶色谱-示差-多角度激光光散射系统, 色谱条件为: 采用凝胶排阻色谱柱 Ohpak SB-805 HQ (300 mm × 8 mm) 和 Ohpak SB-803 HQ (300 mm × 8 mm) 串联。柱温 45 °C, 进样量 100 μL, 流动相 A (0.1 mol/L NaNO₃ 含 0.02% NaN₃), 流量 0.6 mL/min, 洗脱梯度为等度 75 min。以检测的保留时间 (min) 为横坐标, 以摩尔质量 (g/mol) 为纵坐标, 得到绝对分子量分析图; 以摩尔质量 (g/mol) 为横坐标, 以均方根半径 (nm) 为纵坐标得到分子构型图。

1.5.3 傅里叶变换红外光谱分析

称取 1.0 mg 干燥后的 PG 或 CPG 样品与 100 mg 溴化钾粉末混合, 压片。利用傅里叶变换红外光谱仪获得 PG 和 CPG 在 400~4000 cm⁻¹ 范围的光谱^[17]。

1.5.4 核磁共振分析

将 25 mg 干燥的 CPG 加入 1 mL D₂O 中, 完全溶解后冷冻干燥, 冻溶 3 次后使用 Bruker 600 MHz 型核磁共振仪进行测定^[18]。

1.6 溶解度测定

分别称取 PG 和 CPG 各 100 mg, 加入 10 mL 去离子水, 25 °C、200 r/min 恒温搅拌, 每隔 30 min 取

样, 在 0.22 μm 滤膜过滤后用苯酚-硫酸法测定滤液中多糖的质量浓度, 直至质量浓度恒定, 计算溶解度 (mg/mL), 每组平行 3 次。

1.7 CPG 标准品的性能验证

1.7.1 不确定度分析

由均匀性引入的不确定度研究, 称量 CPG 使用工艺用水将其配制为 1 mg/mL 的溶液, 然后进行梯度稀释, 配制为终质量浓度为 200 pg/mL 的标准品冻干品, 批生产量为 1049 支, 按照分装顺序随机分层抽取 11 支。使用丹娜 G 试剂盒以及配套酶标仪 (Sunrise Tecan) 进行均匀性测试。在重复性条件下, 每瓶测试 3 次, 测试顺序: 1、3、5、7、9、11、2、4、6、8、10、11、10、9、8、7、6、5、4、3、2、1、2、4、6、8、10、1、3、5、7、9、11。

1.7.2 准确度分析

使用万级天平称取 CPG 并用工艺用水配制成 1 mg/mL 葡聚糖母液, 梯度稀释后制备成质量浓度为 1、10 ng/mL 的标准物质溶液, 分别向 5 例临床阴性血清样本中加入一定体积的已知浓度 β-1,3-D-葡聚糖检测标准物质溶液, 使标准物质的添加终质量浓度分别为 50、90、150 pg/mL, 所加标准物质溶液与阴性样本基质之间的体积比应不大于 1:20, 每个样本各重复检测 3 次, 根据式 (2) 计算回收率 (R), 结果应符合 80% < R < 120%。

$$R = \frac{\rho \times (V_0 + V) - \rho_0 \times V_0}{V \times \rho_s} \times 100\% \quad (2)$$

式中: ρ 为阴性样本基质中加入标准溶液后的浓度, pg/mL; V_0 为阴性样本基质的体积, mL; V 为加入标准溶液的体积, mL; ρ_0 为阴性样本基质的检测浓度, pg/mL; ρ_s 为标准溶液的浓度, pg/mL。

1.8 稳定性分析

热稳定性分析: 将 CPG 标准品 (200 pg/mL) 分别置于 4、25、37、56 °C 条件下储存, 于 0、7、14、21、28 d 取样, 用 DNK 试剂盒检测浓度, 计算相对标准偏差 (RSD), 要求 RSD < 5%。

储存稳定性分析: 将 CPG 冻干态标准品置于 4 °C 避光储存, 于 0、1、3、6 个月取样复溶至 200 pg/mL, 检测质量浓度变化, 计算 RSD, 要求 RSD < 5%。

1.9 数据分析

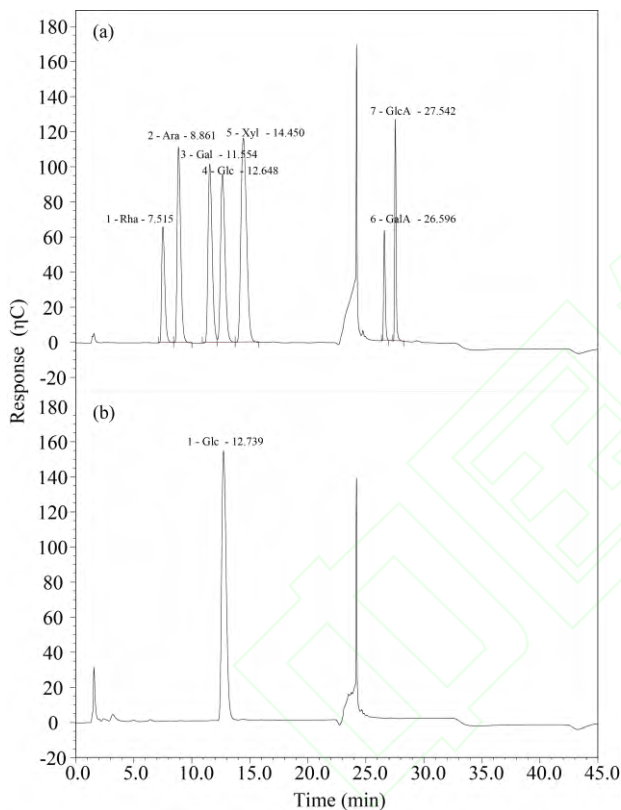
用 MestReNova 15.0 软件分析核磁谱图, 利用软件 ASTRA 6.1 处理色谱数据, 采用 SPSS 25.0、Origin 2019 软件进行数据统计分析, 数据以 “平均值 ± 标准

偏差”表示。

2 结果与分析

2.1 CPG 化学组成分析

通过电位滴定法可知, CPG 取代度为 0.52 ± 0.05 。通过碱提取法获得的 PG 粗糖中的总糖含量为 $(91.10 \pm 2.16)\%$, 且未检测到 CPG 样品中糖醛酸和蛋白质。采用高效阴离子交换色谱-脉冲安培检测器分析 CPG 的单糖组成, 如图 1 所示。从图 1 中可以看出, 仅在 19 min 时出现一处明显吸收峰, 仅有一种衍生物葡萄糖, 纯度较高。



(a, 标准品; b, CPG 样本)

图 1 CPG 单糖组成分析

Fig. 1 CPG monosaccharide composition analysis

2.2 CPG 的结构解析

2.2.1 甲基化分析结果

为了得到糖苷键的连接方式, 对 CPG 进行 GC-MS 分析, 结果如图 2 所示, 基于峰面积归一化法计算糖残基含量, 结果见表 1。CPG 中主要的糖苷键为 $\rightarrow 3)-\beta$ -Glc p-(1 $\rightarrow$, 含有少量的 $\rightarrow 6)-\beta$ -Glc p-(1 $\rightarrow$ 糖苷键以及极少量的 $\rightarrow 4)-\beta$ -Glc p-(1 $\rightarrow$ 糖苷键和

$\rightarrow 2)-\beta$ -Glc p-(1 $\rightarrow$ 糖苷键, 可以说明 CPG 中主要多糖是以 β -1,3-D-葡聚糖为主链的葡聚糖。

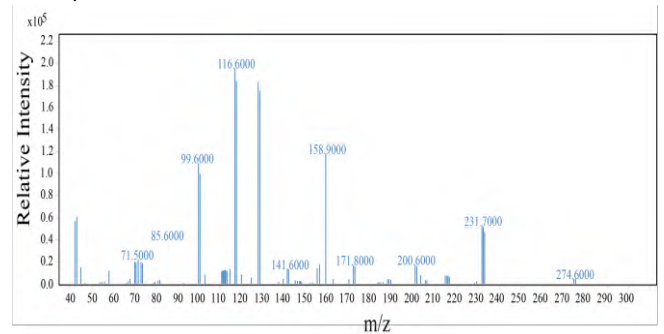


图 2 CPG 甲基化分析质谱图

Fig. 2 Mass spectrum of CPG methylation analysis

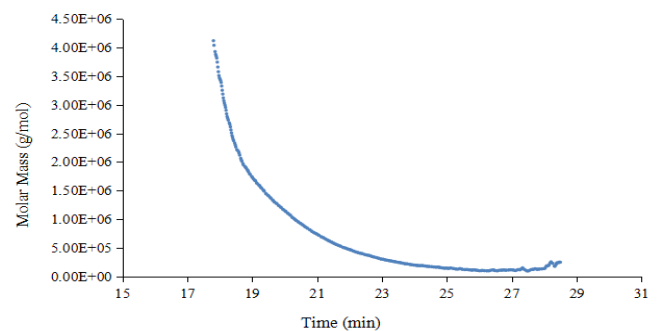
表 1 PG 和 CPG 甲基化分析结果

Tab. 1 Results of CPG methylation analysis

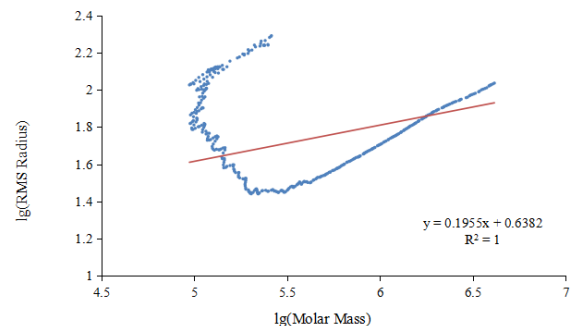
葡萄糖糖残基类型	连接方式	糖残基含量/%
2,4,6-Me ₃ -Glc p	$\rightarrow 3)-\beta$ -Glc p-(1 $\rightarrow$	80.12 ± 2.75
2,3,4-Me ₃ -Glc p	$\rightarrow 6)-\beta$ -Glc p-(1 $\rightarrow$	9.25 ± 0.33
2,3,4,6-Me ₄ -Glc p	Glc p-(1 $\rightarrow$	7.40 ± 1.12
2,3,6-Me ₃ -Glc p	$\rightarrow 4)-\beta$ -Glc p-(1 $\rightarrow$	1.87 ± 0.14
3,4-Me ₂ -Glc p	$\rightarrow 2)-\beta$ -Glc p-(1 $\rightarrow$	1.36 ± 0.09

2.2.2 平均分子量与分子构型分析结果

CPG 平均分子量与分子构型分析结果如图 3 所示。



(a) 分子量分析图



(b) 分子构型图

图3 CPG 平均分子量与分子构型分析

Fig. 3 CPG average molecular weight and molecular configuration analysis

分子量分析中多角度激光光散射信号 (LS, 单位是 V) 的散射光强度与物质的分子尺寸、分子量大小成正比。差信号 (RI, 单位是 RIU) 的响应值取决于柱后流出液折射率的变化, 与物质的类型、浓度和分子量均有关。图 3 (a) 代表的是由上述两种信号拟合出的分子量曲线, 最终分子量检测结果见表 2。图 3 (b) 为分子构型分析图, 以摩尔质量的对数, 即 $\lg(\text{Molar Mass})$ 为横坐标, 以均方根半径的对数, 即 $\lg(\text{RMS Radius})$ 为纵坐标, 线性直线为拟合曲线, 其斜率可以作为分子构型的参考。通常情况下, 斜率=1 表示分子为棒状, 斜率为 0.5~0.6 表示分子为无规则线团, 斜率=1/3 表示分子为球形。在本研究中, CPG 分子构型线性函数为 $y=0.1955x+0.6382$ ($R^2=0.9998$), 表明该分子呈现紧密球形且存在支链高度密集的情况。CPG 的紧密球形是支链密集填充的非理想球形, 即新增分子量 (糖残基) 用于增加支链密度而非扩大半径, 导致斜率小于 1/3。

表 2 分子量分析结果

Tab.2 Molecular weight analysis results

物理量	检测值	物理量	检测值
数均分子量	282745	数均旋转半径/nm	65.352
峰值分子量	435886	重均旋转半径/nm	57.404
重均分子量	612217	Z 均旋转半径/nm	60.667
z 均分子量	1185925	质量分数/%	100.00
多分散性/ (Mw/Mn)	2.165		

2.2.3 傅里叶变换红外光谱分析结果

CPG 的傅里叶变换红外光谱图如图 4 所示。

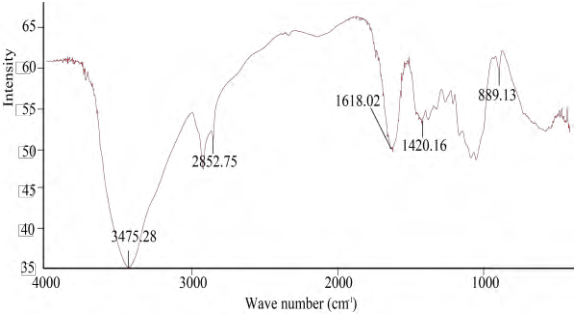


图4 CPG 的傅里叶变换红外光谱图

Fig. 4 Fourier transform infrared spectrum of CPG

在 3250~3500 cm^{-1} 之间的吸收峰为非游离的 O—H 键^[19]。CPG 在 1420 cm^{-1} 附近的峰是羧甲基中—COO—峰的拉伸振动, 是羧甲基化的特征峰, 证明 PG 完成了羧甲基化。在 1600~1640 cm^{-1} 附近出现的特征峰是由于羧酸离子中的 C=O 不对称伸缩振动引起的^[20]。CPG 在 2852.75 cm^{-1} 出现的吸收峰, 可能是由于不对称 C—H 伸缩振动引起的。此外, 880~900 cm^{-1} 之间的吸收峰为 β -型吡喃糖特征峰^[21]。

2.2.4 核磁共振分析结果

CPG 在上述研究中, 峰形较为单一, 其核磁共振图如图 5 所示。借助 ^1H 和 ^{13}C , 以及 COSY)、HSQC、HMBC 和 NOESY 分析, 对得到的 CPG 的主链部分精细结构展开鉴定。别蒙等^[22]的研究表明, 羧甲基化后的茯苓多糖 C1 的化学位移相对于改性前的茯苓多糖, 从 δ 103.55 ppm 移动到了 δ 102.34 ppm。而本研究中茯苓多糖 C1 的化学位移为 102.43 ppm, 与该研究结果较为一致, 说明多糖羧甲基化的成功。结合二维 HSQC 和 HMBC 分析能够证实 CPG 含有羧甲基。此外, CPG 样品中只有一种单糖, 根据出峰的位置确定其为葡萄糖。在 CPG 的 ^1H 谱端基区域 δ_{H} 4.4~4.8 ppm 存在 1 个端基信号, 为 δ_{H} 4.72 ppm, 属于 β -糖苷键构型。端基信号 δ 4.72/102.43 ppm 归属为 $\rightarrow 3)\text{-}\beta\text{-Glc}(1\rightarrow$ 的端基信号。在 ^{13}C 图谱中— $\text{CH}_2\text{-COO-}$ 的亚甲基碳的化学位移为 60~70 ppm, 不同取代位置 (C2、C3、C6 位) 的羧甲基— $\text{CH}_2\text{-}$ 质子峰在 4.0~5.0 ppm 区间内存在细微差异。结合 $^1\text{H}\text{-}^1\text{H}$ COSY 谱、HSQC 谱、HMBC 和 NOESY 谱对 CPG 中各个糖残基的信号进行归属, 以确定该多糖主链为 $\rightarrow 3)\text{-}\beta\text{-Glc}(1\rightarrow$ 聚合而成的含有羧甲基的多糖, 归属结果见表 3。

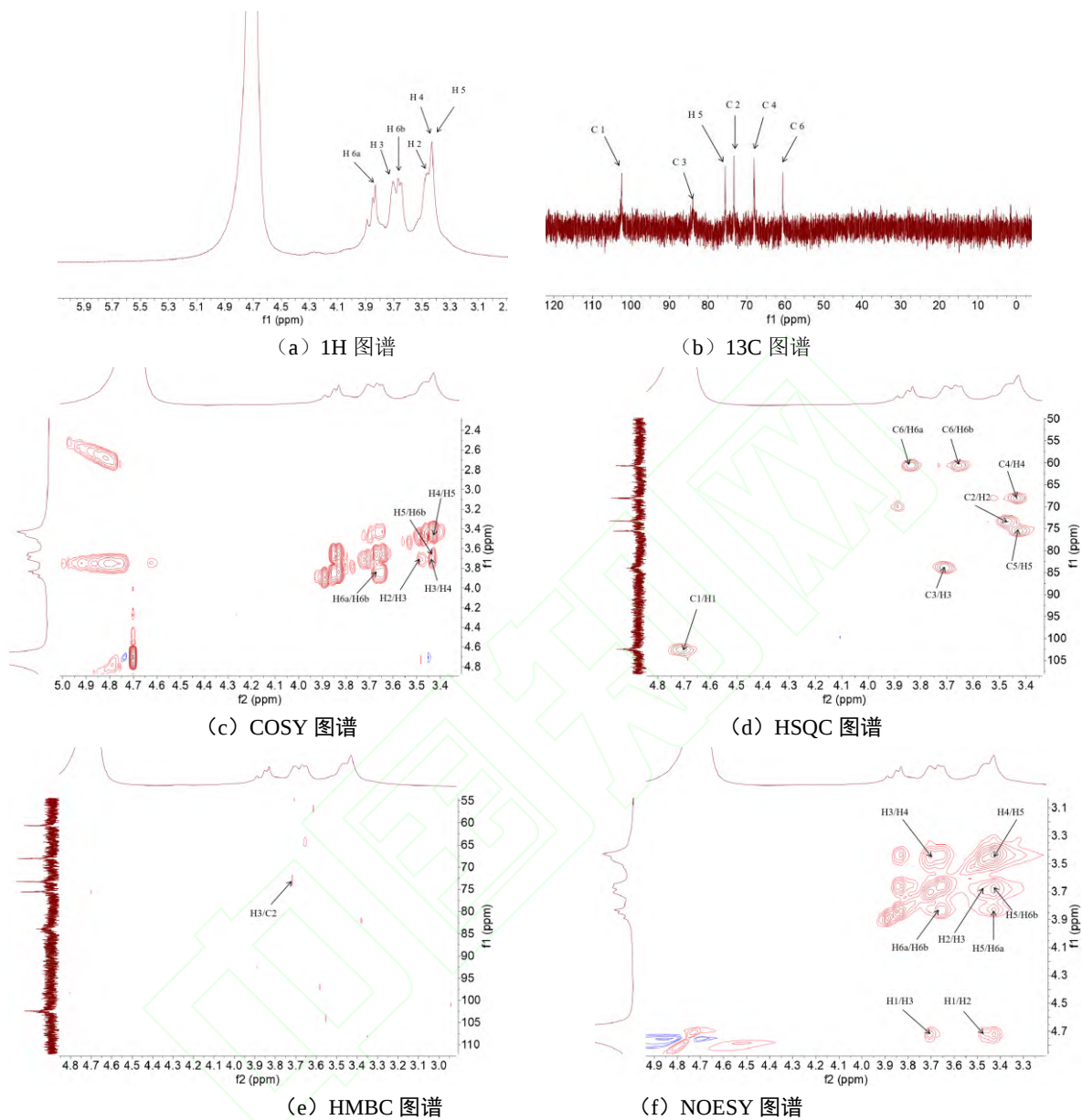


图 5 CPG NMR 图谱

Fig. 5 CPG NMR spectra

表 3 CPG 碳氢信号归属

Tab.3 CPG hydrocarbon signal attribution

糖残基	化学位移/ppm					
	C-1	C-2	C-3	C-4	C-5	C-6
	H-1	H-2	H-3	H-4	H-5	H-6
$\rightarrow$ 3)- β -Glc(1	102.43	73.2	83.9	68.0	75.5	60.6
$\rightarrow$ (A)	4.72	3.47	3.7	3.44	3.43	3.83/ 3.66

2.3 溶解度

25 $^{\circ}\text{C}$ 下 PG 的溶解度仅为 $(0.87 \pm 0.05) \text{ mg/mL}$, 而 CPG 的溶解度达到 $(11.0 \pm 0.32) \text{ mg/mL}$, 提升约 12.6 倍。这是因为羧甲基基团的引入增加了葡聚糖分子的亲水性, 且离子化的 $-\text{COO}-$ 基团可减少分子间氢键作用, 避免聚集^[9]。CPG 的高水溶性可确保其在 G 试验检测体系中均匀溶解, 解决了传统标准品“瓶间差”“批间差”的核心问题。

2.4 CPG 标准品的性能验证

2.4.1 不确定度

在均匀性引入的不确定度研究中, 将配制为终质量浓度为 200 pg/mL 的 PG 和 CPG 标准品冻干品按照分装顺序随机分层抽取 11 支, 进行均匀性测试, 二者理论质量浓度均为 200 pg/mL。结果显示 11 瓶 PG 和 CPG 检测平均浓度分别为 (199.91±11.86) pg/mL 和 (199.68±10.61) pg/mL。

PG 与 CPG 不确定度计算结果见表 4。由表 4 可知, 在 PG 与 CPG 组中, 由于 F 值 2.158 和 1.769 均小于 $F_{0.05}$ 值 2.297, 可以认为两组在 $\alpha=0.05$ 显著性水平下不存在显著差异, 即瓶间差异不显著。PG 组的组间平方和 (SS) 为 2230.46, 而 CPG 组为 1606.54。这表明 CPG 组不同组之间的差异相对 PG 组更小, 即 PG 组间的离散程度更小。组间均方 (MS) 表明, PG 组的组间均方 223.046 大于 CPG 组的

160.654, 进一步验证了 CPG 组在组间的平均变异程度更小。PG 组的 F 值 2.158 大于 CPG 组的 1.769, PG 组的 F 值更接近临界值 $F_{0.05}$, 说明其组间差异相对 CPG 组更有可能达到显著水平, 然而在当前的显著性水平下, 这种差异仍然不显著。PG 与 CPG 组的由于瓶间不均匀性引入的测量不确定度分别为 6.32 pg/mL 和 4.83 pg/mL, 表明 CPG 组的测量结果相对更可靠。总体而言, PG 组和 CPG 组在 $\alpha=0.05$ 的显著性水平下, 各自组间均未表现出显著差异, 但 PG 组在组间的变异程度相对 CPG 组较大。此外, PG 与 CPG 制备的葡聚糖标准品瓶间差异不显著, 符合行标 YY/T 1729-2020 关于批内瓶间差的要求, 即由于均匀性引入的不确定度并不会对试剂性能造成显著影响, 对于临床样本检验阴阳性判断影响较小^[23]。

表 4 PG 与 CPG 不确定度计算结果

Tab.4 Uncertainty calculation results of PG and CPG

类别		平方和(SS)	自由度(df)	均方(MS)	F	$F_{0.05}$	不确定度
PG	组间	2230.46	10	223.046	2.158	2.297	6.32 pg/mL
	组内	2273.66	22	103.348			
	总计	4504.12	32				
CPG	组间	1606.54	10	160.654	1.769	2.297	4.83 pg/mL
	组内	1997.57	22	90.799			
	总计	3604.10	32				

2.4.2 准确度

从回收率均值来看, 添加浓度为 50 pg/mL、100 pg/mL 和 150 pg/mL 时的回收率均值分别为 0.988 ± 0.058 、 1.020 ± 0.063 和 1.006 ± 0.066 , 均接近 1, 且处于 80%~120% 范围内, 符合回收试验要求。这表明 CPG 在不同添加浓度下整体的回收效果较好, 添加的标准物质大部分能够有效检出。不同血清样本之间回收率的波动不大, 标准物质在不同样本中的回收表现较为稳定。综合回收率均值和标准差的结果, 可以认为该标准物质可以用于 G 试验。

2.5 CPG 标准品的稳定性

2.5.1 热稳定性

CPG 标准品的热稳定性结果如图 6 所示。CPG 标准品在 4 °C、25 °C、37 °C 和 56 °C 储存 28 d 后, 其浓度的 RSD 分别为 0.18%、0.59%、0.34%、0.39%, 均小于 5%, 表明 CPG 在临床常规储存条件下稳定性良好, 可耐受短期运输过程中的温度波动。

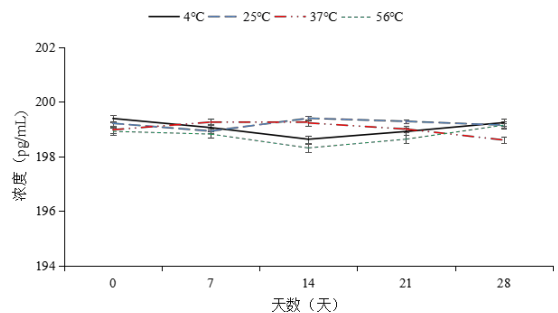


图 6 CPG 标准品的热稳定性分析

Fig. 6 Thermal stability analysis of CPG standard

2.5.2 长期储存稳定性

4 °C 避光储存 6 个月后, CPG 标准品的浓度为 (198.7±3.2) pg/mL, 与初始浓度 200 pg/mL 的 RSD 为 0.65% (即<5%), 表明其长期储存稳定性满足标准品“有效期 1 年”的要求。

3 结 论

本研究聚焦 CPG 在侵袭性真菌感染辅助诊断方面的应用价值, 通过对 PG 进行提取、羧甲基化修饰及成分和结构分析, 成功解决了传统 G 试验标准品的核心缺陷。首先, 其均一性有了显著提高。PG 天然为 β -1,3-葡聚糖主链, 含有较少的 β -1,6-分支, 总糖含量超 90%, 无糖醛酸、蛋白质干扰, 甲基化分析证实其主要糖苷键为 $(\rightarrow 3)\text{-}\beta\text{-GlcP}\text{-}(1\rightarrow)$ 。羧甲基化后, CPG 主链结构未破坏, NMR 显示 CPG 是主链为 $(\rightarrow 3)\text{-}\beta\text{-GlcP}\text{-}(1\rightarrow)$ 聚合而成的含有羧甲基的多糖。其次, CPG 的溶解度较 PG 提升 12.6 倍。高水溶性使 CPG 在检测体系中均匀溶解, 可有效降低瓶间差。此外, CPG 回收率接近 100%, 热稳定性及长期稳定性均满足标准品要求, 且与 ACC、DNK 两种主流试剂盒兼容, 表明其可作为通用型 G 试验标准品。

本研究仍有一定的局限性: 仅验证了 CPG 与两种试剂盒的兼容性, 未来需扩大试剂盒种类, 如胶体金法、荧光法; 临床样本量较少, 需纳入念珠菌病、曲霉菌病等不同感染类型的样本进一步验证。后续研究将聚焦 CPG 的规模化制备工艺优化, 以及与国际标准品的比对, 推动其标准化应用。

参考文献:

- [1] Liu Xiaopan, Ren Zhe, Yu Ruihong, et al. Structural characterization of enzymatic modification of *Hericium erinaceus* polysaccharide and its immune-enhancement activity[J]. International Journal of Biological Macromolecules, 2021, 166: 1396-1408.
- [2] Choi O K, Yang C S, Kim E D, et al. Improving solubility through carboxymethylation of different-sized endosperm, bran, and husk rice powders[J]. Food Science and Biotechnology: Food Science and Biotechnology, 2009, 18(6): 1439-1446.
- [3] Deng Laiqing, Huang Gangliang. Preparation, structure and application of polysaccharides from *Poria cocos*[J]. RSC Advances, 2024, 14(42): 31008-31020.
- [4] Ng J Y C, Lai Y P N, Ng M W, et al. Chemical structures, extraction and analysis technologies, and bioactivities of edible fungal polysaccharides from *Poria cocos*: an updated review[J]. International Journal of Biological Macromolecules, 2024, 261(1): 129555.
- [5] Lü Yaoshong, Yang Yajun, Chen Ying, et al. Structural characterization and immunomodulatory activity of a water-soluble polysaccharide from *Poria cocos*[J]. International Journal of Biological Macromolecules, 2024, 261(Pt 2): 129878.
- [6] Deng Laiqing, Huang Gangliang. The medicinal value of natural and modified *Poria cocos* polysaccharides[J]. Polymer Bulletin, 2024, 81(18): 16355-16372.
- [7] 张熠璇, 雷敏, 黄家浩, 等. 微生物降解制备水溶性茯苓多糖及其抗氧化活性[J]. 食品研究与开发, 2023, 44(15): 136-141.
- [8] 周际松, 汪芷玥, 汤凯, 等. 羧甲基化茯苓多糖的抗氧化性分析[J]. 中国食品添加剂, 2020, 31(07): 120-125.
- [9] WANG Y, MO Q, LI Z, et al. Effects of degree of carboxymethylation on physicochemical and biological properties of pachyman[J]. International Journal of Biological Macromolecules, 2012, 51(5): 1052-1056.
- [10] 罗卓雅, 谭宏渊, 谢佳琳, 等. 碱溶性茯苓多糖的抗氧化作用[J]. 食品研究与开发, 2022, 43(22): 86-91.
- [11] Dubois M, Gilles K A, Hamilton J K, et al. Colorimetric method for determination of sugars and related substances[J]. Analytical Chemistry, 1956, 28(3): 350-354.
- [12] Blumenkrantz N, Hansen G A. New method for quantitative determination of uronic acids[J]. Analytical Biochemistry, 1973, 54(2): 484-489.
- [13] Sedmak J J, Grossberg S E. A rapid, sensitive, and versatile assay for protein using Coomassie brilliant blue G250[J]. Analytical Biochemistry, 1977, 79(1/2): 544-552.
- [14] 赵屹, 臧文文, 张继翔, 等. 香茶多糖的提取纯化与结构解析[J]. 食品与发酵工业, 2025, 51(8): 29-36
- [15] Xu Ming, Qi Mingyue, Goff H D, et al. Polysaccharides from sunflower stalk pith: chemical, structural and functional characterization[J]. Food Hydrocolloids, 2020, 100: 105082.
- [16] Zheng Zhaomin, Huang Qilin, Ling Chuqi. Water-soluble yeast β -glucan fractions with different molecular weights: extraction and separation by acidolysis assisted-size exclusion chromatography and their association with proliferative activity[J]. International Journal of

Biological Macromolecules, 2019, 123:269-279.

- [17] 朱晏锋. 黑牛肝菌多糖结构表征及其缓解阿尔茨海默病功效的研究[D]. 长春: 吉林大学, 2024.
- [18] 王珂鑫, Park I, 许海燕, 等. 工程菌毕赤酵母发酵液制备 β -葡寡糖的结构表征及其透皮性[J]. 香料香精化妆品, 2024, 4: 113-119.
- [19] 刘星汶. 羧甲基茯苓多糖的制备及构效关系研究[D]. 广州: 华南理工大学, 2021.
- [20] 贺莉, 张悦, 李贞景, 等. 红甜菜多糖的结构及体外酵解特性[J]. 食品研究与开发, 2024, 45(17): 105-112.
- [21] 刘晓菲. 羧甲基茯苓多糖的纯化及生物活性研究[D]. 广州: 华南理工大学, 2018.
- [22] 别蒙, 谢笔钧, 孙智达. 不同取代度水溶性羧甲基茯苓多糖的制备、结构表征及体外抑菌活性[J]. 食品科学, 2020, 41(12): 67-76.
- [23] 国家药品监督管理局. 真菌(1-3)- β -D-葡聚糖测定试剂盒: YY/T 1729-2020 [S].