

[19] 中华人民共和国国家知识产权局

[51] Int. Cl.

G01N 33/53 (2006.01)

G01N 33/535 (2006.01)



[12] 发明专利申请公布说明书

[21] 申请号 200610020036.1

[43] 公开日 2007 年 2 月 14 日

[11] 公开号 CN 1912620A

[22] 申请日 2006.8.24

[21] 申请号 200610020036.1

[71] 申请人 武汉邦之德牧业科技有限公司

地址 430071 湖北省武汉市武昌体育馆特 1
号香格里拉园 C1-2002

[72] 发明人 葛向阳 彭楠 吴晓峰 杨亭
梁运祥

[74] 专利代理机构 武汉开元专利代理有限公司
代理人 王和平

权利要求书 1 页 说明书 6 页 附图 1 页

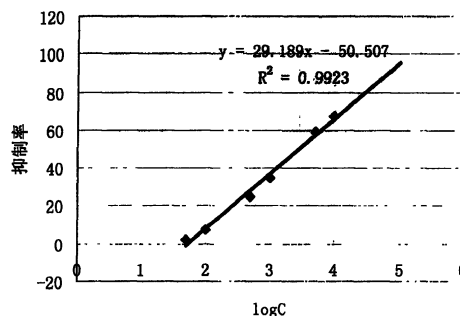
[54] 发明名称

大豆球蛋白和大豆伴球蛋白含量的 ELISA 检测方法

[57] 摘要

本发明公开了大豆球蛋白和大豆伴球蛋白含量的 ELISA 检测方法，具体地说涉及一种检测大豆、豆粕及相关产品中大豆球蛋白和大豆伴球蛋白含量的方法。本发明是用等电点沉淀和亲和层析等方法纯化的大豆球蛋白和大豆伴球蛋白分别作为抗原，获得抗大豆球蛋白和大豆伴球蛋白的抗体，将其分别用作间接抑制酶联免疫法检测大豆、豆粕及相关产品中大豆球蛋白和大豆伴球蛋白含量。本发明的优越性在于这种方法检测准确、过程简单、灵敏度高，可满足相关企业单位批量检测大豆、豆粕及相关产品中大豆球蛋白和大豆伴球蛋白含量的需要。

间接抑制ELISA标准曲线



1、大豆球蛋白和大豆伴球蛋白含量的 ELISA 检测方法，在于它使用等电沉淀、盐析和凝胶过滤层析纯化大豆球蛋白和大豆伴球蛋白作为抗原获得抗体，将其分别用作间接抑制酶联免疫法检测大豆、豆粕及相关产品中大豆球蛋白和大豆伴球蛋白含量，其具体步骤如下：

1) 脱脂大豆粉在缓冲液 A 中提取得到含大豆球蛋白和大豆伴球蛋白的溶液，

2) 将溶液 pH 调至 6.4 得到沉淀 1 和上清液。上清 pH 调至 4.8，得到沉淀 2，

3) 将沉淀 1 溶解在缓冲液 B 中，过凝胶过滤柱，得到纯化的大豆球蛋白，

4) 将沉淀 2 溶解在缓冲液 B 中，盐析得到沉淀 3，

5) 将沉淀 3 溶解在缓冲液 B 中，过凝胶过滤柱，得到纯化的大豆伴球蛋白，

6) 用大豆球蛋白和大豆伴球蛋白免疫动物，获得抗血清，

7) 盐析纯化抗体，检测抗体效价，

8) 用间接抑制酶联免疫法检测大豆、豆粕及相关产品中大豆球蛋白和大豆伴球蛋白含量。

2、按权利要求 1 所述的大豆球蛋白和大豆伴球蛋白含量的 ELISA 检测方法，其特征在于：缓冲液 A 为 0.03-0.06mol/L 的 Tris-HCl 缓冲液，含 10mmol/L β -巯基乙醇，pH8.0。

3、按权利要求 1 所述的大豆球蛋白和大豆伴球蛋白含量的 ELISA 检测方法，其特征在于：缓冲液 B 为磷酸盐缓冲液，含 0.5mol/L 的 NaCl，10mmol/L β -巯基乙醇，pH8.0。

4、按权利要求 1 所述的大豆球蛋白和大豆伴球蛋白含量的 ELISA 检测方法，其特征在于：凝胶过滤介质为 Sepharose 6B。

5、按权利要求 1 所述的大豆球蛋白和大豆伴球蛋白含量的 ELISA 检测方法，其特征在于：免疫动物为健康雄性新西兰大白兔。

6、按权利要求 1 所述的大豆球蛋白和大豆伴球蛋白含量的 ELISA 检测方法，其特征在于：免疫方法为混合免疫法。

7、按权利要求 1 所述的大豆球蛋白和大豆伴球蛋白含量的 ELISA 检测方法，其特征在于：酶联免疫方法为间接抑制酶联免疫法。

大豆球蛋白和大豆伴球蛋白 含量的 ELISA 检测方法

技术领域

本发明涉及一种检测大豆、豆粕及相关产品中大豆球蛋白和大豆伴球蛋白含量的方法，具体地说，涉及一种 ELISA（酶联免疫吸附测定法）定量检测大豆、豆粕及相关产品中大豆球蛋白和大豆伴球蛋白含量的方法。

背景技术

豆粕是饲料行业最重要的蛋白原料之一，但是豆粕饲料中的大豆球蛋白和大豆伴球蛋白具有较强的抗原性，是豆粕中主要的抗原蛋白。其抗营养作用主要包括：由于部分抗原蛋白质作为完整的大分子蛋白质不被直接吸收，而不是氨基酸或多肽，降低了饲料蛋白质的利用；由于活化免疫系统而提高了维持的需要；增加内源蛋白质的分泌，导致粪氮的增加；较敏感的动物出现过敏反应，导致腹泻，生产性能下降甚至死亡。在家畜方面，对含大豆伴球蛋白和球蛋白饲料抗原过敏反应的研究主要集中在仔猪和犊牛。由于生产水平的提高，犊牛早期补料，仔猪断奶时间大幅度提前，断奶日粮中蛋白质水平的提高和大豆及其加工产品的广泛应用，使得仔猪和犊牛断奶后吸收不良和临床腹泻成为生产上的重大难题。

近年来，抗原蛋白在饲料学和动物营养学的研究越来越受重视，这是因为人们要求动物生长得更快来满足食品行业的生产需要，由此要求动物能更多的获得可消化、易吸收的养分，而抗营养因子是一种限制营养利用的潜在因素。大豆中绝大部分的抗营养因子的组成、结构和性质已经研究得比较清楚，在国外，各种抗营养因子的定性定量检测方法已比较成熟；在国内，除了大豆球蛋白和大豆伴球蛋白外，大豆中多数抗营养因子已经有了比较成熟的定性和定量测定方法。但

是作为最重要的两种抗营养因子，大豆球蛋白和大豆伴球蛋白的定性定量检测成为了国内饲料学及动物营养学研究的热点。

目前国内主要用 SDS-PAGE 进行定性检测大豆球蛋白和大豆伴球蛋白，还没有有效、方便、准确的定量检测方法。

发明内容

本发明的目的是：克服 SDS-PAGE 检测的缺点，提供一种检测大豆球蛋白和大豆伴球蛋白含量的 ELISA 检测方法，具体地说要解决以下问题：

- 1) 豆粕原料中大豆球蛋白和大豆伴球蛋白含量的检测；
- 2) 发酵豆粕中大豆球蛋白和大豆伴球蛋白含量的检测；
- 3) 其他豆粕饲料中大豆球蛋白和大豆伴球蛋白含量的检测。

本发明的目的是这样实现的：用以等电点沉淀和亲和层析等方法纯化的大豆球蛋白和伴球蛋白为抗原免疫大白兔获得抗体，将其用作间接抑制 ELISA 检测大豆、豆粕及相关产品中大豆球蛋白和大豆伴球蛋白含量。

本发明其具体步骤如下：

- 1) 脱脂大豆粉在缓冲液 A 中提取得到含大豆球蛋白和大豆伴球蛋白的溶液，
- 2) 将溶液 pH 调至 6.4 得到沉淀 1 和上清液。上清 pH 调至 4.8，得到沉淀 2，
- 3) 将沉淀 1 溶解在缓冲液 B 中，过凝胶过滤柱，得到纯化的大豆球蛋白，
- 4) 将沉淀 2 溶解在缓冲液 B 中，盐析得到沉淀 3，
- 5) 将沉淀 3 溶解在缓冲液 B 中，过凝胶过滤柱，得到纯化的大豆伴球蛋白，
- 6) 用大豆球蛋白和大豆伴球蛋白免疫动物，获得抗血清，
- 7) 盐析纯化抗体，检测抗体效价，
- 8) 用间接抑制酶联免疫法检测大豆、豆粕及相关产品中大豆球蛋白和大豆伴球蛋白含量。

本发明所述的缓冲液 A 为 0.03-0.06mol/L 的 Tris-HCl 缓冲液，

含 10mmol/L β -巯基乙醇, pH8.0。

本发明所述的缓冲液 B 为磷酸盐缓冲液 (2.6mmol/L KH_2PO_4 , 32.5mmol/L K_2HPO_4), 含 0.5mol/L 的 NaCl, 10mmol/L β -巯基乙醇, pH8.0。

本发明所述的凝胶过滤介质为 Sepharose 6B。

本发明所述的免疫动物为健康雄性新西兰大白兔。

本发明所述的免疫方法为混合免疫法。

本发明所述的酶联免疫方法为间接抑制酶联免疫法。

下面进一步详细描述本发明大豆球蛋白和大豆伴球蛋白含量的 ELISA 检测方法的建立过程和检测过程如下:

1) 将脱脂大豆粉与 0.03-0.06 mol/L, pH 8.0 的 Tris-HCl 缓冲液 A 混合, 料水比 1:10-20, 28-37°C 提取 1-2 小时。收集上清液 1。将上清液 1 pH 调至 6.4, 10,000rpm 离心 20min。得到沉淀 1 和上清液 2。

2) 将沉淀 1 用磷酸盐缓冲液 B(含 0.5mol/L 的 NaCl, 10mmol/L β -巯基乙醇, pH 8.0)溶解, 离心收集上清过 Sepharose 6B, 用磷酸盐缓冲液 B (同上) 洗脱, 收集流对应吸收峰的溶液, 即纯化的大豆球蛋白 (11S 蛋白)。

3) 将纯化的大豆球蛋白 (11S 蛋白) 装入截留分子量 8,000-12,000 的透析袋, 对 PBS 缓冲液透析过夜。收集透析液, 浓缩, 小份分装, 冷冻干燥保存。

4) 将上清液 2 的 pH 调制 4.8, 10,000rpm 离心 20min 收集沉淀 2。将沉淀 2 用磷酸盐缓冲液 (同上) 洗脱, 溶解, 过 Sepharose 6B。用磷酸盐缓冲液 B (同上) 洗脱, 收集流对应吸收峰的溶液, 即纯化的大豆伴球蛋白 (7S 蛋白)。

5) 将纯化的大豆伴球蛋白 (7S 蛋白) 装入截留分子量 8,000-12,000 的透析袋, 对 PBS 缓冲液透析过夜。收集透析液, 浓缩, 小份分装, 冷冻干燥保存。

6) 取上述纯化两种蛋白用 PBS 缓冲液配成 1-5mg/ml 的溶液,

分别与等量的弗氏完全佐剂乳化，初次免疫健康雄性新西兰大白兔，每只大白兔剂量 1-1.5ml，免疫部位为双脚后掌皮下。两周后用以上两种蛋白溶液与弗氏不完全佐剂的乳化液加强免疫，免疫剂量为 1-1.5ml/只大白兔，免疫部位为双后腿腘淋巴结。再一周后对流电泳或间接 ELISA 检测抗体效价。效价合适后颈动脉放血收集抗血清。

7) 将收集的抗大豆球蛋白和抗大豆伴球蛋白的抗血清用盐析法纯化，再次检测效价后小量分装，一部分冷冻干燥保存，另一部分与等量无菌甘油混合后-20℃保存。

8) 间接抑制 ELISA 标准曲线的建立。以检测大豆球蛋白为例，其方法是：用间接 ELISA 检测的大豆球蛋白最佳浓度包被酶标板，4℃包被过夜，次日洗板并将大豆球蛋白分别做 0（参照）、50、500、1,000、5,000、10,000ng/ml 的系列稀释，取 50μl 依次加入酶标板孔中，每个梯度 6 个重复，然后各孔中分别加入按最佳稀释度稀释的抗大豆球蛋白抗体 50μl，混匀，28-37℃孵育 30-60min，洗板，每孔加入 1:10,000 酶标羊抗兔 IgG 各 100μl，孵育 1 小时，然后洗板，每孔加入 TMB 底物 100μl，37℃显色 10-15min 后，每孔加入 50μl 2mol/L 的硫酸终止液。然后送入酶标仪中在 450nm 波长下检测每孔 OD 值。其中抑制率（%）=（参照孔 OD 值- 检测孔 OD 值）×100/参照孔 OD 值。以以上梯度稀释的抗原检测到的 OD 值建立标准曲线：以抑制率为纵轴，抗原浓度的对数为横轴。大豆伴球蛋白的标准曲线建立方法同上。

大豆球蛋白和大豆伴球蛋白的定量检测。按方法 8) 建立标准曲线，待测蛋白溶液稀释到合适浓度后也按方法 8) 做 6 个重复后检测 OD 值。根据待测蛋白的 OD 值在标准曲线中查出对应浓度对数值再换算出蛋白溶液的实际浓度。

本发明的优越性在于这种方法检测准确、过程简单、灵敏度高，可满足相关企业单位批量检测大豆、豆粕及相关产品中大豆球蛋白和

大豆伴球蛋白含量的需要。

附图说明

图 1 间接抑制 ELISA 标准曲线图例。

其中，抑制率为纵轴，抗原浓度的对数为横轴。

具体实施方式

按本发明大豆球蛋白和大豆伴球蛋白含量的 ELISA 检测方法，具体实施操作步骤如下：

1) 将脱脂大豆粉与 0.03 mol/L, pH 8.0 的 Tris-HCl 缓冲液混合，料水比 1: 20, 37℃提取 1 小时。收集上清液。将上清液 pH 调至 6.4, 10,000rpm 离心 20min。得到沉淀 1。

2) 将沉淀用磷酸盐缓冲液缓冲液(含 0.5mol/L 的 NaCl, 10mmol/L β -巯基乙醇, pH 8.0)溶解，离心收集上清过 Sepharose 6B, 用磷酸盐缓冲液缓冲液(同上)洗脱，收集流对应吸收峰的溶液，即纯化的大豆球蛋白(11S 蛋白)。

3) 将纯化的大豆球蛋白(11S 蛋白)装入截留分子量 8,000-12,000 的透析袋，对 PBS 缓冲液透析过夜。收集透析液，浓缩，小份分装，冷冻干燥保存。

4) 取适量大豆球蛋白用 PBS 缓冲液配成 5mg/ml 的溶液，与等量的弗氏完全佐剂乳化，初次免疫健康雄性新西兰大白兔，每只大白兔剂量 1ml，免疫部位为双脚后掌皮下。两周后用上述溶液与弗氏不完全佐剂的乳化液加强免疫，免疫剂量为 1ml/只大白兔，免疫部位为双后腿腓淋巴结。再一周后对流电泳或间接检测抗体效价。效价合适后颈动脉放血收集抗血清。

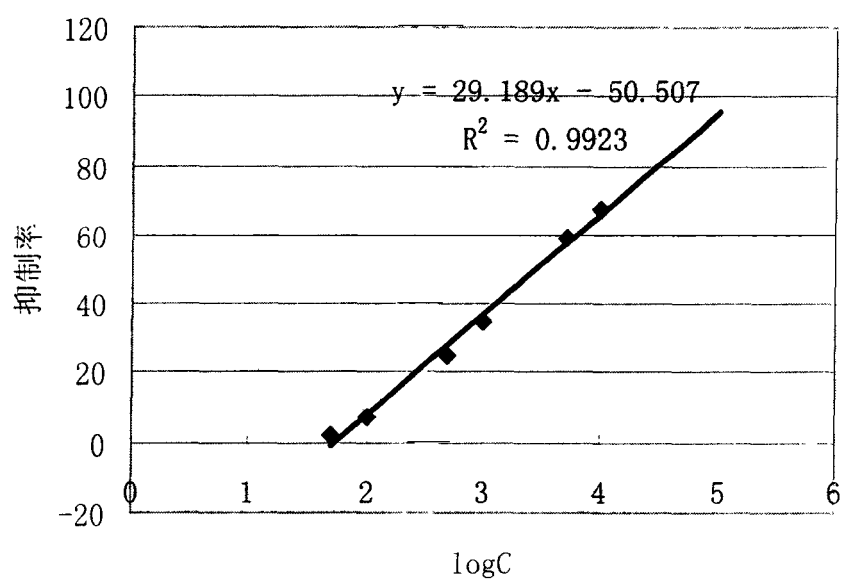
5) 将收集的抗大豆球蛋白的抗血清用盐析法纯化，间接 ELISA 检测效价后小量分装，一部分冷冻干燥保存，另一部分与等量无菌甘油混合后-20℃保存。

6) 间接抑制 ELISA 标准曲线的建立。其方法是：用间接 ELISA

检测的大豆球蛋白最佳包被浓度 4 μ l/ml 包被酶标板，每孔 100 μ l，4 $^{\circ}$ C 包被过夜，次日洗板并将大豆球蛋白分别做 0（参照）、50、500、1,000、5,000、10,000ng/ml 的稀释，取 50 μ l 依次加入酶标板孔中，每个梯度 6 个重复，然后各孔中分别加入间接 ELISA 检测的最佳稀释度(1:640,000)稀释的抗大豆球蛋白抗体 50 μ l，混匀，37 $^{\circ}$ C 孵育 30min，洗板，每孔加入 1:10,000 酶标羊抗兔 IgG 各 100 μ l，孵育 1 小时，然后洗板，每孔加入 TMB 底物 100 μ l，37 $^{\circ}$ C 显色 15min 后，每孔加入 50 μ l 2mol/L 的硫酸终止液。然后送入酶标仪中在 450nm 波长下检测每孔 OD 值。其中抑制率（%）=（参照孔 OD 值- 检测孔 OD 值） $\times$ 100/参照孔 OD 值。以以上梯度稀释的抗原检测到的 OD 值建立标准曲线：以抑制率为纵轴，抗原浓度的对数为横轴。大豆伴球蛋白的标准曲线建立方法同上。

7) 大豆球蛋白定量检测。按方法 8) 建立标准曲线，待测蛋白溶液稀释到合适浓度后也按方法 8) 做 6 个重复后检测 OD 值。根据待测蛋白的 OD 值在标准曲线中查出对应浓度对数值再换算出蛋白溶液的实际浓度。

间接抑制ELISA标准曲线



专利名称(译)	大豆球蛋白和大豆伴球蛋白含量的ELISA检测方法		
公开(公告)号	CN1912620A	公开(公告)日	2007-02-14
申请号	CN200610020036.1	申请日	2006-08-24
[标]申请(专利权)人(译)	武汉邦之德牧业科技有限公司		
申请(专利权)人(译)	武汉邦之德牧业科技有限公司		
当前申请(专利权)人(译)	武汉邦之德牧业科技有限公司		
[标]发明人	葛向阳 彭楠 吴晓峰 杨亭 梁运祥		
发明人	葛向阳 彭楠 吴晓峰 杨亭 梁运祥		
IPC分类号	G01N33/53 G01N33/535		
代理人(译)	王和平		
外部链接	Espacenet SIPO		

摘要(译)

本发明公开了大豆球蛋白和大豆伴球蛋白含量的ELISA检测方法，具体地说涉及一种检测大豆、豆粕及相关产品中大豆球蛋白和大豆伴球蛋白含量的方法。本发明是用等电点沉淀和亲和层析等方法纯化的大豆球蛋白和大豆伴球蛋白分别作为抗原，获得抗大豆球蛋白和大豆伴球蛋白的抗体，将其分别用作间接抑制酶联免疫法检测大豆、豆粕及相关产品中大豆球蛋白和大豆伴球蛋白含量。本发明的优越性在于这种方法检测准确、过程简单、灵敏度高，可满足相关企业单位批量检测大豆、豆粕及相关产品中大豆球蛋白和大豆伴球蛋白含量的需要。

间接抑制ELISA标准曲线

