

网络出版时间:2014-02-28 13:13

DOI:10.13207/j.cnki.jnwafu.2014.03.012

网络出版地址: <http://www.cnki.net/kcms/doi/10.13207/j.cnki.jnwafu.2014.03.012.html>

仔猪血清大豆抗原蛋白抗体间接 ELISA 检测方法的建立

寇亚楠,马良友,罗莹,王希春,吴金节

(安徽农业大学 动物科技学院,安徽 合肥 230036)

[摘要] **【目的】**研究并建立大豆抗原蛋白血清抗体间接 ELISA 检测方法。**【方法】**首先用大豆抗原蛋白对仔猪进行致敏,然后采用棋盘滴定法确定最佳抗原包被质量浓度及血清稀释倍数,并对其他条件进行优化,最终建立检测血清大豆抗原蛋白 11S、7S 抗体的间接 ELISA 方法,确立待测血清判定标准,并对建立的 ELISA 方法进行重复性、准确性和敏感性检测。**【结果】**建立的 ELISA 方法的最佳反应条件为:11S 抗原蛋白最适包被质量浓度为 2.0 $\mu\text{g/mL}$,包被作用时间 37 $^{\circ}\text{C}$ 下 2 h;将 10 g/L BSA 作为封闭液,37 $^{\circ}\text{C}$ 封闭 1 h;待测血清 37 $^{\circ}\text{C}$ 作用 1 h;酶标二抗最适稀释度为 1:1 500,37 $^{\circ}\text{C}$ 作用 1 h;显色剂最佳显色时间 15 min。7S 抗原蛋白的最适包被质量浓度为 2.5 $\mu\text{g/mL}$,包被作用时间 37 $^{\circ}\text{C}$ 下 2 h;将 10 g/L BSA 作为封闭液,37 $^{\circ}\text{C}$ 封闭 1 h;待测血清 37 $^{\circ}\text{C}$ 作用 1 h;酶标二抗最适稀释度为 1:1 500,37 $^{\circ}\text{C}$ 作用 1 h;显色剂最佳显色时间 25 min。11S 和 7S 抗原蛋白间接 ELISA 检测方法的批内、批间变异系数均小于 10%,重复性较好,灵敏度较高。**【结论】**建立了仔猪血清大豆抗原蛋白抗体间接 ELISA 检测方法,该法具有很强的特异性和敏感性,可用于大豆抗原蛋白 11S、7S 过敏反应的临床诊断。

[关键词] 大豆抗原蛋白;仔猪;血清抗体;间接 ELISA

[中图分类号] S852.4⁺3

[文献标志码] A

[文章编号] 1671-9387(2014)03-0017-06

Establishment of an indirect enzyme-linked immune sorbent assay for detection of serum antibody of soybean antigen protein in piglets

KOU Ya-nan, MA Liang-you, LUO Ying, WANG Xi-chun, WU Jin-jie

(College of Animal Science and Technology, Anhui Agricultural University, Hefei, Anhui 230036, China)

Abstract: **【Objective】** The experiment was conducted to establish an indirect enzyme-linked immune sorbent assay (ELISA) to detect the serum antibody levels in piglets sensitized by soybean antigen protein. **【Method】** After the piglets were sensitized with 11S or 7S, the serum samples were collected and the reactive conditions were optimized. The optimal coating mass concentrations of antigens and dilution times of sera were determined using board titration method. An indirect enzyme-linked immune sorbent assay to detect the serum contents of 11S and 7S in piglets was then established and its repeatability, accuracy and sensitivity were detected. **【Result】** The optimal conditions of ELISA 11S were: the coating mass concentration was 2.0 $\mu\text{g/mL}$, the action time of the coating at 37 $^{\circ}\text{C}$ was 2 h; using 10 g/L BSA as sealing fluid for 1 h at 37 $^{\circ}\text{C}$; the test serum worked for 1 h at 37 $^{\circ}\text{C}$, the enzyme labeled antibody was diluted into 1:1 500 and the reactive time was 1 h at 37 $^{\circ}\text{C}$, and the reaction time of substrate was 15 min. The optimal conditions of ELISA 7S were: the coating mass concentration was 2.5 $\mu\text{g/mL}$ and the action time of the coating

[收稿日期] 2013-03-21

[基金项目] 科技部科技富民强县专项行动计划项目(国科发农【2012】745号)

[作者简介] 寇亚楠(1988—),女,河南鹿邑人,在读硕士,主要从事畜禽营养代谢病研究。E-mail: kouyanan1130@163.com

[通信作者] 吴金节(1962—),男,安徽望江人,教授,主要从事动物诊疗技术及营养代谢病研究。E-mail: wjj@ahau.edu.cn

at 37 ℃ was 2 h, using 10 g/L BSA as sealing fluid for 1 h at 37 ℃; the test serum worked for 1 h at 37 ℃, the enzyme labeled antibody was diluted into 1 : 1 500 and the reaction time was 1 h at 37 ℃, and the reaction time of substrate was 25 min. Both intra-assay and inter-assay variation coefficients were less than 10%. 【Conclusion】 The established indirect ELISA for detection of serum antibody levels in piglets sensitized by soybean antigen protein had good repeatability and high sensitivity, and could be used in clinical diagnosis of allergy induced by soybean protein antigen.

Key words: soybean antigen protein; piglets; serum antibody; indirect ELISA

大豆及其产品是畜禽生产中应用最广泛的一种优质植物蛋白源,不仅蛋白质含量丰富,而且必需氨基酸的绝对含量高,组成比例平衡^[1]。然而,大豆中存在的致敏因子能引发人和动物短暂的过敏反应,如引起腹泻和消化吸收障碍,甚至死亡^[2-6]。因此大豆成为联合国规定的八大主要致敏食物之一。大量研究表明,大豆引起动物发生过敏反应的主要致敏因子是大豆抗原蛋白,而大豆球蛋白(glycinin)和β-伴大豆球蛋白(β-conglycinin)是大豆抗原蛋白中的主要抗原成分^[7-9]。按离心沉降系数和免疫学方法,大豆球蛋白和β-伴大豆球蛋白分别被称为11S蛋白和7S蛋白,二者占大豆蛋白的65%~80%^[10]。11S蛋白是一种六聚体蛋白,占总蛋白的40%。7S蛋白是一种三聚体蛋白,含α、α'和β亚基^[11-12],这3个亚基都是潜在的过敏原,有研究指出,7S蛋白比11S蛋白更易引起过敏^[13]。

大豆抗原蛋白引起的过敏,不仅威胁人类的健康,也给畜禽业造成了巨大的经济损失,目前应用较多的预防方法是定量检测饲料中的致敏物质,而不能对已经致敏的动物进行诊断,更不能排除动物饲料中大豆抗原蛋白这类致敏物质。本试验利用纯化的大豆抗原蛋白(11S和7S)饲喂仔猪,使其致敏,建立大豆抗原蛋白酶联免疫吸附反应(ELISA)检测方

法,并通过该方法检测仔猪血液中的大豆抗原蛋白抗体水平,深入研究能够快捷、准确地诊断大豆抗原蛋白过敏反应的方法,为动物大豆源性过敏反应的早期诊断提供技术支持。

1 材料与方法

1.1 试验动物

21日龄“杜×长×大”三元杂交断奶仔猪,由安徽省宿州市辉煌良种猪有限公司提供。

1.2 试剂和仪器

大豆球蛋白(11S)、β-伴大豆球蛋白(7S)由中国农业大学食品工程学院提供,纯化后的11S和7S蛋白由安徽农业大学动物科技学院临床兽医学实验室提供,纯度分别为90%和90.6%。冷冻高速离心机,购自珠海黑马医学仪器有限公司;酶标仪,购自美国Bio Rad公司;其他试剂有舒泰100(Virbac)、羊抗猪IgG-HRP(Solarbio)、BSA(Solarbio)、显色剂TMB(Solarbio)、脱脂奶粉、明胶、醋酸钠、柠檬酸、甘油等。

1.3 试验饲料

仔猪代乳料和基础日粮分别为仔猪断奶前和断奶后的饲料,其具体配方和营养水平详见表1、表2。

表 1 仔猪代乳料配方及其营养水平

Table 1 Ingredients and nutrient levels of the milk replacer for piglets

代乳料组成 Ingredients	质量分数/% Mass fraction	营养指标 Nutrition	含量 Contents
全脂奶粉 Dried whole milk	46.0	代谢能/(MJ·kg ⁻¹) DE	4.54
脱脂奶粉 Dried skim milk	42.2	干物质/(g·kg ⁻¹) DM	750.00
乳清粉 Whey	10.5	粗蛋白/(g·kg ⁻¹) CP	279.00
食盐 Salt	0.3	Ca/(g·kg ⁻¹)	10.40
预混料 Compound premix	1.0	P/(g·kg ⁻¹)	8.90

注:预混料向每千克代乳料提供:VA 7 000 IU,VD₃ 2 000 IU,VE 10 IU,VK₃ 2.2 mg,VB₁ 2.375 mg,VB₂ 4.8 mg,VB₆ 0.15 mg,VB₁₂ 0.017 5 mg,烟酸(烟酰胺)16 mg,泛酸钙5.75 mg,叶酸0.85 mg,生物素0.017 5 mg,赖氨酸0.95 mg,抗氧化剂0.045 mg,酶制剂1 100 mg,香味剂45 mg,甜味剂45 mg,Mn(MnSO₄·H₂O)20.18 mg,I(KI)0.4 mg,Se(Na₂SeO₃)0.35 mg。

Note:For one kilogram of milk replacer,compound premix provides:VA 7 000 IU,VD₃ 2 000 IU,VE 10 IU,VK₃ 2.2 mg,VB₁ 2.375 mg,VB₂ 4.8 mg,VB₆ 0.15 mg,VB₁₂ 0.017 5 mg,Niacin 16 mg,Pantothenic calcium 5.75 mg,Folic acid 0.85 mg,D-biotin 0.017 5 mg,Lysine 0.95 mg,Antioxidant 0.045 mg,Enzyme preparation 1 100 mg,Flavour agents 45 mg,Sweet agents 45 mg,Mn(MnSO₄·H₂O)20.18 mg,I(KI)0.4 mg,and Se(Na₂SeO₃)0.35 mg.

表 2 仔猪断奶后的基础日粮配方及其营养水平

Table 2 Ingredients and nutrient levels in basal diets for piglets after weaning

日粮组成 Ingredients	质量分数/% Mass fraction	营养指标 Nutrition	含量 Contents
玉米 Corn	60.85	代谢能/(MJ·kg ⁻¹) DE	13.54
膨化全脂豆粕 Expanding full fat soybean meal	25.00	干物质/(g·kg ⁻¹) DM	836.00
乳清粉 Whey	5.00	粗蛋白/(g·kg ⁻¹) CP	208.30
进口鱼粉 Fish meal	5.00	Ca/(g·kg ⁻¹)	6.40
统糠 Bran	0.37	P/(g·kg ⁻¹)	5.10
石粉 Limestone	0.69	赖氨酸/(g·kg ⁻¹) Lys	10.60
磷酸氢钙 CaHPO ₄	2.20	Cu/(mg·kg ⁻¹)	15.00
食盐 Salt	0.25	Fe/(mg·kg ⁻¹)	144.00
预混料 Compound premix	0.49	Zn/(mg·kg ⁻¹)	109.20
氯化胆碱 Choline chloride	0.15		

注:预混料向每千克基础日粮提供: V_A 5 250 IU, V_{D₃} 1 050 IU, V_E 4.5 IU, V_{K₃} 1.2 mg, V_{B₁} 0.375 mg, V_{B₂} 1.8 mg, V_{B₆} 0.15 mg, V_{B₁₂} 0.007 5 mg, 烟酸(烟酰胺)6 mg, 泛酸钙 3.75 mg, 叶酸 0.15 mg, 生物素 0.007 5 mg, 赖氨酸 0.75 mg, 抗氧化剂 0.045 mg, 酶制剂 1 000 mg, 香味剂 40 mg, 甜味剂 40 mg, Mn (MnSO₄·H₂O) 10.18 mg, I (KI) 0.4 mg, Se (Na₂SeO₃) 0.3 mg。

Note: For one kilogram of basal diet, compound premix provides: V_A 5 250 IU, V_{D₃} 1 050 IU, V_E 4.5 IU, V_{K₃} 1.2 mg, V_{B₁} 0.375 mg, V_{B₂} 1.8 mg, V_{B₆} 0.15 mg, V_{B₁₂} 0.007 5 mg, Niacin 6 mg, Pantothenic calcium 3.75 mg, Folic acid 0.15 mg, D-biotin 0.007 5 mg, Lysine 0.75 mg, Antioxidant 0.045 mg, Enzyme preparation 1 000 mg, Flavour agents 40 mg, Sweet agents 40 mg, Mn (MnSO₄·H₂O) 10.18 mg, I (KI) 0.4 mg, and Se (Na₂SeO₃) 0.3 mg.

1.4 试验分组及饲养管理

试验采取完全随机设计,将 30 头临床检查健康的 21 日龄断奶仔猪随机分为对照组、11S 蛋白致敏组和 7S 蛋白致敏组。在仔猪 21~27 日龄与 32~34 日龄时,分别进行初次致敏和再次致敏。在 11S 蛋白和 7S 蛋白致敏组基础日粮中分别加入质量分数 4% 的 11S 蛋白和 7S 蛋白。整个饲养过程在产仔舍和保育舍进行,采用全封闭饲养管理。所有仔猪从 14 日龄开始诱食饲喂仔猪代乳料,21 日龄断奶后饲喂基础日粮。试验仔猪采取群饲,自由采食和饮水,免疫消毒程序均按猪场常规方法进行。

1.5 仔猪血清样品的采集

分别在 21、29 和 36 日龄时,每天上午 07:00—08:00 对所有仔猪空腹采血,室温静置 2 h 后,3 000 r/min 离心 10 min,分离血清,-20 ℃ 保存备用。

1.6 大豆抗原蛋白的皮肤致敏试验

对 39 日龄仔猪进行皮肤致敏试验。从每个试验组中分别随机选取 4 头仔猪,用舒泰 100 麻醉后,针刺测试麻醉程度,无明显反应后,仰卧保定,剃毛,用油性记号笔在每头仔猪腹部剃毛皮肤上划出皮试范围并分 3 个区域标记,分别在相应区域皮内注射 0.1 mL 5 mg/mL 7S 或 11S 蛋白溶液和生理盐水,在注射 30 min 后,观察并记录皮肤各点反应。通过皮肤红斑直径来评价大豆抗原蛋白的致敏性,评价标准为:1 级,记为“-”,未见红斑;2 级,记为“±”,红斑直径>0~≤5 mm;3 级,记为“+”,红斑直径>5~≤10 mm;4 级,记为“++”,红斑直径>10~

≤20 mm;5 级,记为“+++”,红斑直径>20 mm。

1.7 大豆抗原蛋白抗体间接 ELISA 检测方法的建立

1.7.1 11S 和 7S 抗原蛋白间接 ELISA 最佳反应条件的确定 分别以纯化的 11S 和 7S 抗原蛋白为包被抗原,采用棋盘滴定法,对抗原的包被质量浓度(表 3、表 4)、封闭液的种类(10 g/L 明胶、10 g/L BSA、100 g/L BSA、50 和 100 g/L 脱脂奶粉)、血清稀释倍数(表 3、表 4)、酶标二抗的稀释度(1:1 000,1:1 500,1:2 000,1:2 500,1:5 000)及各自的作用时间(包被时间设 4 ℃ 过夜、37 ℃ 2 h;封闭时间设 0.5,1 和 2 h;血清及酶标二抗时间同封闭时间)、显色时间(10,15,20 和 25 min)进行筛选。用酶标仪测定 OD₄₅₀ 值,选取阳性血清 OD₄₅₀ 值约为 1,阴性孔 OD₄₅₀ 值约为 0.1,且待测孔的 OD₄₅₀ 值/阴性孔 OD₄₅₀ 值最大的组合为最佳反应条件。

1.7.2 11S 蛋白和 7S 蛋白抗血清的交叉反应 分别以 11S 和 7S 抗原蛋白最佳包被质量浓度包被反应板,按 11S 蛋白抗原与 11S 蛋白抗血清 100% 反应的 OD₄₅₀,计算 7S 蛋白抗血清与 11S 蛋白抗原的交叉反应率;按 7S 蛋白抗原与 7S 蛋白抗血清 100% 反应的 OD₄₅₀,计算 11S 蛋白抗血清与 7S 蛋白抗原的交叉反应率。

1.7.3 重复性试验 在同一块酶标板内检测仔猪 36 日龄时所采血中的 5 份抗体血清样品,每组 5 个重复,按照间接 ELISA 操作程序进行测定,计算血清样品 OD₄₅₀ 值的变异系数(CV),以检验批内检测

样品的重复性;随机取 6 块经抗原包被的酶标板,在相同条件下检测 5 份抗体血清样品,计算血清样品在不同批间的 CV,以检验批间检测样品的重复性。

1.7.4 检测结果的判定方法 取 6 份阴性血清(按 1 : 1 600 体积比稀释),在已建立的间接 ELISA 最适条件下测定,并经统计学分析,计算 OD₄₅₀ 平均值($\bar{X}$)和标准误差(SE)。根据统计学原理,待测血清 OD₄₅₀ 值 $\geq \bar{X} + 3SE$ 时,判定为阳性;待测血清 OD₄₅₀ 值 $\leq \bar{X} + 2SE$ 者判为阴性;介于二者之间者判为可疑。

1.7.5 间接 ELISA 法检测大豆抗原蛋白抗体方法的应用 用建立的间接 ELISA 法检测试验组中皮肤致敏试验呈阳性的仔猪血清和对照组仔猪血清,其中 11S 蛋白组和 7S 蛋白组阳性血清各 8 份,对照组血清 8 份,验证该方法的敏感性和准确性。

2 结果与分析

2.1 大豆抗原蛋白皮肤致敏试验结果

皮肤致敏试验 30 min 后,对于 11S 和 7S 蛋白致敏组的仔猪而言,生理盐水注射点仔猪皮肤致敏

试验评价结果为“—”或“±”,说明过敏反应不明显;而 11S 和 7S 蛋白注射点皮肤反应均较明显,评判结果均在“+”级以上,其中 7S 蛋白致敏组仔猪的反应尤为明显,评判结果达到“++”级以上,表明仔猪皮肤红斑呈不同程度的阳性反应,证明大豆抗原蛋白使 39 日龄仔猪产生了过敏反应。

2.2 大豆抗原蛋白间接 ELISA 检测条件的优化

2.2.1 ELISA 条件的确定 11S 和 7S 抗原蛋白不同包被质量浓度及血清抗体稀释倍数的间接 ELISA 检测结果见表 3 和表 4。另外通过其他多项试验最终确定 11S 抗原的最适包被质量浓度为 2.0 $\mu\text{g/mL}$,包被作用时间为 37 $^{\circ}\text{C}$ 下 2 h;将 10 g/L BSA 作为封闭液,37 $^{\circ}\text{C}$ 封闭 1 h;待测血清最适稀释度为 1 : 1 600,37 $^{\circ}\text{C}$ 作用 1 h;酶标抗体最适稀释度为 1 : 1 500,37 $^{\circ}\text{C}$ 作用 1 h;最佳显色时间 15 min。7S 蛋白抗原的最适包被质量浓度为 2.5 $\mu\text{g/mL}$,包被作用时间为 37 $^{\circ}\text{C}$ 下 2 h;将 10 g/L BSA 作为封闭液,37 $^{\circ}\text{C}$ 封闭 1 h;待测血清最适稀释度为 1 : 1 600,37 $^{\circ}\text{C}$ 作用 1 h;酶标抗体最适稀释度为 1 : 1 500,37 $^{\circ}\text{C}$ 作用 1 h;最佳显色时间 25 min。

表 3 11S 蛋白不同包被质量浓度和血清抗体稀释倍数的 ELISA 结果 (OD₄₅₀)

包被质量浓度/ ($\mu\text{g} \cdot \text{mL}^{-1}$) Coating quality concentration	阳性血清稀释倍数 Serum dilution times											
	100	200	400	800	1 600	3 200	6 400	12 800	25 600	51 200	102 400	204 800
10.00	2.818	2.529	1.660	1.269	1.117	0.651	0.591	0.486	0.141	0.137	0.111	0.144
5.00	2.910	2.808	1.865	1.283	1.094	0.692	0.542	0.507	0.184	0.165	0.183	0.137
4.00	2.939	2.613	1.677	1.265	1.045	0.694	0.532	0.525	0.181	0.233	0.179	0.167
3.00	2.970	2.678	1.579	1.286	1.062	0.660	0.641	0.428	0.191	0.195	0.171	0.186
2.00	2.245	1.849	1.516	1.249	1.026	0.692	0.529	0.552	0.218	0.227	0.184	0.190
1.00	2.320	1.827	1.669	1.270	0.964	0.696	0.563	0.544	0.187	0.174	0.162	0.177
0.50	2.275	1.895	1.746	1.220	1.028	0.665	0.528	0.520	0.180	0.187	0.209	2.316
0.15	2.315	1.707	1.670	1.250	1.103	0.655	0.520	0.523	0.181	0.154	0.180	0.047

表 4 7S 蛋白不同包被质量浓度和血清抗体稀释倍数的 ELISA 结果 (OD₄₅₀)

包被质量浓度/ ($\mu\text{g} \cdot \text{mL}^{-1}$) Coating quality concentration	阳性血清稀释倍数 Serum dilution times											
	100	200	400	800	1 600	3 200	6 400	12 800	25 600	51 200	102 400	204 800
5.00	2.574	2.404	2.005	1.344	1.195	1.162	0.914	0.772	0.518	0.271	0.266	0.217
4.00	2.623	2.153	1.529	1.198	1.207	1.148	0.873	0.429	0.422	0.419	0.280	0.292
3.00	2.636	2.326	1.624	1.478	1.071	1.116	0.880	0.387	0.348	0.197	0.172	0.106
2.50	2.124	1.806	1.460	1.216	1.053	0.911	0.908	0.858	0.764	0.687	0.412	0.177
2.00	2.704	2.348	1.735	1.187	0.941	0.928	0.834	0.269	0.241	0.197	0.148	0.148
1.00	2.735	2.428	1.841	1.244	0.933	0.868	0.796	0.225	0.163	0.149	0.135	0.149
0.50	2.792	2.399	1.940	1.136	0.892	0.861	0.829	0.204	0.176	0.164	0.190	2.201
0.25	2.781	2.474	1.743	1.069	0.901	0.826	0.796	0.192	0.199	0.210	0.201	0.046

2.2.2 交叉性试验 交叉性试验结果表明,11S 蛋白抗血清与 7S 蛋白抗原的交叉率为 15%,7S 蛋白抗血清与 11S 蛋白抗原的交叉率为 35%,说明 11S 蛋白抗血清的特异性比 7S 蛋白高。

2.2.3 重复性试验 11S 抗原蛋白的批内、批间变异系数见图 1,7S 抗原蛋白的批内、批间变异系数见图 2。由图 1 和图 2 可以看出,11S 抗原蛋白和 7S 抗原蛋白的批内、批间变异系数均小于 10%,说明

本试验建立的间接 ELISA 检测方法具有较好的重

复性。

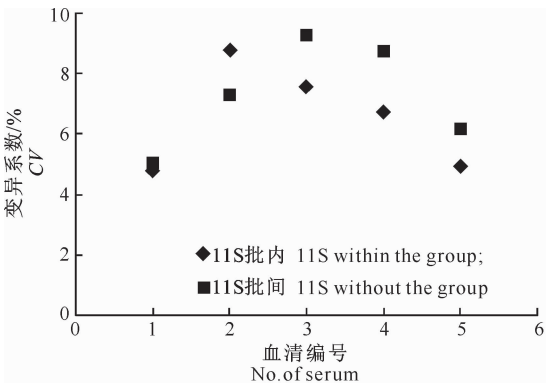


图 1 基于 ELISA 最适反应条件检测 11S 抗原蛋白的重复性试验结果

Fig. 1 Repeatability results of 11S protein antigen detection based on the optimal reaction conditions of ELISA

2.2.4 检测结果的判定标准 取 6 份阴性血清稀释至 1 600 倍,用建立的 ELISA 最适反应条件进行检测,结果显示,11S 蛋白的 OD₄₅₀ 平均值为 0.148,标准误差(SE)为 0.027,临界值 $\bar{X} + 3SE = 0.229$,故待测血清 OD₄₅₀ ≥ 0.229 即可判为阳性,待测血清 OD₄₅₀ ≤ 0.202 为阴性,之间判为可疑。取 6 份阴性血清稀释至 1 600 倍时,7S 蛋白的 OD₄₅₀ 平均值为 0.151,标准误差(SE)为 0.026,临界值 $\bar{X} + 3SE = 0.229$,故待测血清 OD₄₅₀ ≥ 0.229 即可判为阳性,待测血清 OD₄₅₀ ≤ 0.203 为阴性,之间则判为可疑。

2.2.5 间接 ELISA 法检测大豆抗原蛋白抗体临床应用的准确性 用已建立的间接 ELISA 法对待检血清进行检测,结果检出 11S 阳性血清 5 份,可疑 2 份,阴性 9 份;检出 7S 阳性血清 6 份,可疑 1 份,阴性 9 份。11S 抗原蛋白抗体的间接 ELISA 方法敏感性为 87.5% (7/8),准确性为 81.3% (13/16);7S 抗原蛋白抗体的间接 ELISA 方法敏感性为 87.5% (7/8),准确性为 87.5% (14/16)。

3 讨论

目前,国内外对大豆抗原蛋白的研究主要集中在降低或者消除大豆抗原蛋白方面,如使用膨化、热乙醇变性、热加工等^[14-15]的物理消除法,通过改善酶作用条件、优化酶制剂组合^[16]的酶制剂法,利用外源酶对大豆抗原蛋白进行酶解的微生物发酵法,采用蛋白质糖基化工程对蛋白质表面的糖链进行改造的蛋白质性质改良法^[17],以及利用基因敲除使某些基因无法表达的作物育种法等,来消除大豆中的致敏因子。有报道称,日本和美国已经研究或培育出

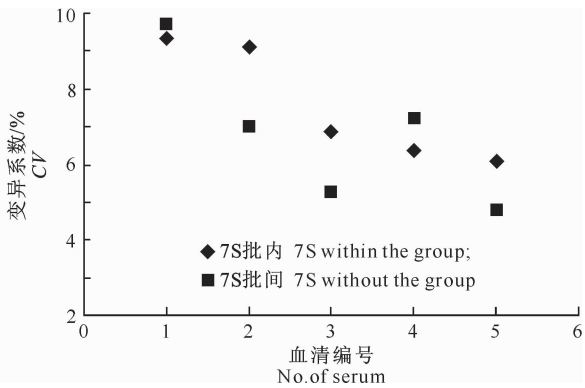


图 2 基于 ELISA 最适反应条件检测 7S 抗原蛋白的重复性试验结果

Fig. 2 Repeatability results of 7S protein antigen detection based on the optimal reaction conditions of ELISA

低致敏的大豆品种^[18-19]。但这些方法不能完全去除致敏物质,而且成本高。此外,虽然有新品种培育出,但因复杂的食品安全评估和农业推广问题,导致其无法在生产实践中得到广泛应用。这些研究都是基于对大豆本身的处理,而本试验从动物对大豆的过敏反应出发,拟建立一种针对大豆抗原蛋白发生过敏反应的快捷、准确、方便的诊断方法,可以对早期的过敏性疾病进行诊断,以减少生产上的损失。

本试验建立的 ELISA 方法,所用的大豆抗原蛋白纯度均达到 90% 以上,达到了大豆抗原蛋白抗体的血清学诊断方法对抗原的要求。通过建立的 ELISA 方法确定 11S 蛋白的最佳包被质量浓度为 2.0 μg/mL,7S 蛋白的最佳包被质量浓度为 2.5 μg/mL,这可能与 11S 蛋白的纯度比 7S 蛋白纯度稍高有关。重复性试验结果显示,11S 蛋白和 7S 蛋白的批内、批间变异系数均小于 10%,说明该方法具有较好的重复性。交叉性试验结果显示,11S 蛋白抗血清与 7S 蛋白抗原的交叉率为 15%,7S 蛋白抗血清与 11S 蛋白抗原的交叉率为 35%,说明 11S 蛋白抗血清的特异性比 7S 蛋白高。7S 蛋白抗血清与 11S 蛋白抗原有交叉反应,这一结论与以往报道^[20]一致,可能与 7S 蛋白和 11S 蛋白有部分相同表位有关,因此造成 7S 蛋白抗体血清中部分抗体能够识别 11S 蛋白。用建立的间接 ELISA 方法进行盲检得出,11S 抗原蛋白抗体的敏感性为 87.5% (7/8),准确性为 81.3% (13/16);7S 抗原蛋白抗体的敏感性为 87.5% (7/8),准确性为 87.5% (14/16),表明该方法具有良好的敏感性和准确性。

ELISA 作为一种新的免疫诊断技术,自 20 世

纪 70 年代问世以来,被广泛地应用于细菌学、病毒学、肿瘤学和血清学的诊断与检测中。在兽医领域中,首次将 ELISA 用于检测口蹄疫病毒抗原。目前,国内外还没有关于人或动物大豆抗原蛋白食入性过敏的 ELISA 诊断方法报道,所以该方法的建立具有一定的临床应用价值,不仅为大豆抗原蛋白引起的过敏性疾病的诊断和调查提供了有效的技术手段,而且为大豆抗原蛋白抗体检测试剂盒的开发奠定了基础。

[参考文献]

- [1] 王桂芹,李子平,孙 丽,等. 不同加工处理大豆制品对鲤鱼鱼种生产性能的影响 [J]. 华南农业大学学报, 2010, 31(2): 95-99.
Wang G Q, Li Z P, Sun L, et al. Effects of variously processed soybeans meal on production performance of *Cyprinus carpio* Juveniles [J]. Journal of South China Agricultural University, 2010, 31(2): 95-99. (in Chinese)
- [2] Rozenfld P, Docena G H, Fosseti C A. Detection and identification of a soy protein component that cross-reacts with caseins from cow's milk [J]. J Clin Exp Immunol, 2002, 130(1): 49-58.
- [3] Niggemann B, Sielaff B, Beyer K, et al. Outcome of double-blind, placebo-controlled food challenge tests in 107 children with atopic dermatitis [J]. Clinical Experimental Allergy, 1999, 29(1): 91-96.
- [4] Holzhauser T, Wackermann O, Ballmer-Weber B K, et al. Soybean (*Glycine max*) allergy in Europe: Gly m 5 (b-conglycinin) and Gly m 6 (glycinin) are potential diagnostic markers for severe allergic reactions to soy [J]. Allergy Clin Immunol, 2009, 2(123): 452-458.
- [5] Christensen H R, Bruum S W, Frøkiaer H. Antigenic specificity of serum antibodies in mice fed soy protein [J]. Int Arch Allergy Immunol, 2003, 132(1): 58-67.
- [6] 徐述亮,王希春,王 勇,等. 大豆球蛋白和 β -伴大豆球蛋白对断奶仔猪的免疫原性试验 [J]. 畜牧与兽医, 2010, 42(10): 24-28.
Xu S L, Wang X C, Wang Y, et al. Investigation on the immunogenicity of glycinin and β -conglycinin in weanling piglets [J]. Animal Husbandry & Veterinary Medicine, 2010, 42(10): 24-28. (in Chinese)
- [7] Liu X, Feng J, Xu Z R, et al. Oral allergy syndrome and anaphylactic reaction in BALB/c mice caused by soybean glycinin and β -conglycinin [J]. Clinical Experimental Allergy, 2008, 38(2): 350-356.
- [8] Jürgen van de Lagemaat, Silván J M, Moreno F J, et al. *In vitro* glycation and antigenicity of soy proteins [J]. Food Research International, 2007, 40(1): 153-160.
- [9] 林化成,姬洪波. 大豆抗原蛋白的致敏作用及其缓解机制的研究进展 [J]. 中国畜牧兽医, 2011, 38(7): 38-42.
Lin H C, Ji H B. Research advances of mechanism of soybean antigen protein induced allergic reaction and attenuation [J]. Chinese Journal of Animal Science, 2011, 38(7): 38-42. (in Chinese)
- [10] 朱 翠,蒋宗勇,郑春田,等. 大豆抗原蛋白的组成及其致敏作用机理 [J]. 动物营养学报, 2011, 23(12): 2053-2063.
Zhu C, Jiang Z Y, Zheng C T, et al. Soybean antigenic protein: Composition and allergy mechanisms [J]. Chinese Journal of Animal Nutrition, 2011, 23(12): 2053-2063. (in Chinese)
- [11] Wadahama H, Iwasaki K, Matsusaki M, et al. Urade accumulation of {beta}-conglycinin in soybean cotyledon through the formation of disulfide bonds between {alpha}'- and {alpha}-subunits [J]. Plant Physiology, 2012, 158(3): 1395-1405.
- [12] Krishnan H B, Kim W S, Jang S, et al. All three subunits of soybean β -conglycinin are potential food allergens [J]. J Agric Food Chem, 2009, 57(3): 938-943.
- [13] Green B J, Cummings K J, Rittenour W R, et al. Occupational sensitization to soy allergens in workers at a processing facility [J]. Clinical & Experimental Allergy, 2011, 41(7): 1022-1030.
- [14] 陈翠莲,窦丽娟,张英东,等. 膨化大豆质量和营养价值评估要点 [J]. 饲料工业, 2010, 31(11): 48-51.
Chen C L, Dou L J, Zhang Y D, et al. Outline of evaluation of extrusion soybean's quantity and nutritional value [J]. Feed Industry, 2010, 31(11): 48-51. (in Chinese)
- [15] 鲍宇茹,魏雪芹. 大豆抗营养因子研究概况 [J]. 中国食物与营养, 2010(9): 20-23.
Bao Y R, Wei X Q. Research survey of soybean antinutrition factors [J]. China Food and Nutrition, 2010(9): 20-23. (in Chinese)
- [16] 王之盛,况应谷,周安国,等. 酶解去除大豆产品抗原蛋白的效果研究 [J]. 饲料博览, 2004(11): 1-4.
Wang Z S, Kuang Y G, Zhou A G, et al. Research on the effect of enzymolysis clearing off soybean antigen protein [J]. Feed Review, 2004(11): 1-4. (in Chinese)
- [17] 赵洪亮,刘志敏. 蛋白质糖基化工程 [J]. 中国生物工程杂志, 2003, 23(9): 18-23.
Zhao H L, Liu Z M. Protein glycoengineering [J]. China Biotechnology, 2003, 23(9): 18-23. (in Chinese)
- [18] 尹 红. 美国科学家首次成功培育过敏性低大豆品种 [J]. 粮食油脂, 2003(1): 22.
Yin H. American scientist firstly successfully breed soybean variety which contain low irritability [J]. Journal of Cereals and Oils, 2003(1): 22. (in Chinese)
- [19] 张可喜. 日本研究出不易引起过敏的大豆 [J]. 大豆通报, 2002(3): 30.
Zhang K X. Japanese research the soybean which difficult to lead allergy [J]. Soybean Bulletin, 2002(3): 30. (in Chinese)
- [20] Geoffrey W P, Nigel L, Mills E N C, et al. Characterization of monoclonal antibodies against beta-conglycinin from soybean (*Glycine max*) and their use as probes for thermal denaturation [J]. Sci Food Agric, 1995, 67(4): 511-520.