

[19] 中华人民共和国国家知识产权局



[12] 发明专利申请公布说明书

[21] 申请号 200810246198.6

[51] Int. Cl.

G01N 33/68 (2006.01)

G01N 33/53 (2006.01)

[43] 公开日 2009年7月15日

[11] 公开号 CN 101482567A

[22] 申请日 2008.12.30

[21] 申请号 200810246198.6

[71] 申请人 安徽农业大学

地址 230036 安徽省合肥市长江西路130号

共同申请人 安徽天邦饲料科技有限公司

安徽天邦生物技术有限公司

[72] 发明人 李吕木 韩景华 张邦辉 宋国福

权利要求书1页 说明书3页 附图1页

[54] 发明名称

一种大豆11S球蛋白含量的检测方法

[57] 摘要

本发明公开了一种测定检测大豆、豆粕及相关产品中11S球蛋白含量的ELISA方法。本发明采用等电点沉淀与凝胶层析纯化大豆11S球蛋白作为抗原，并免疫动物获得抗血清，然后提取抗大豆球蛋白抗体与辣根过氧化物酶连接作为酶标抗体，用作双抗体夹心酶联免疫法检测大豆、豆粕及相关产品中大豆11S球蛋白的含量。本发明的优越性在于该法检测快速、准确且灵敏度极高。

1、大豆 11S 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 11S 球蛋白作为抗原免疫动物获得抗体，将其用作双抗体夹心酶联免疫法检测大豆、豆粕及相关产品中大豆 11S 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的溶液；

2) 将溶液 pH 调至 6.4 得到沉淀 1 和上清液；

3) 将沉淀 1 溶解在缓冲液 B 中，并加固体硫酸铵制得 51-66%硫酸铵沉淀组分，过凝胶过滤柱，得到纯化的大豆 11S 球蛋白；

4) 用大豆 11 球蛋白免疫动物，获得抗血清；

5) 盐析和凝胶过滤层析，检测抗体效价；

6) 将纯化抗体与辣根过氧化物酶连接作为酶标抗体；

7) 用双抗体夹心酶联免疫法检测大豆、豆粕及相关产品中大豆球蛋白含量。

2、按权利要求 1 所述的大豆 11S 球蛋白含量的 ELISA 检测方法，其特征在于：缓冲液 A 为 0.01-0.03mol/L 的 Tris-HCl 的缓冲液，含 10mmol/L 2-巯基乙醇，pH8.0。

3、按权利要求 1 所述的大豆 11S 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 0.4mol/L 的 NaCl，10mmol/L 2-巯基乙醇，pH7.6。

4、按权利要求 1 所述的大豆 11S 球蛋白含量的 ELISA 检测方法，其特征在于：凝胶过滤介质为 Sepharose CL-6 B。

5、按权利要求 1 所述的大豆 11S 球蛋白含量的 ELISA 检测方法，其特征在于：免疫动物为兔。

6、按权利要求 1 所述的大豆球蛋白含量的 ELISA 检测方法，其特征在于：纯化抗体凝胶介质为 Sephadex G-200。

7、按权利要求 1 所述的大豆球蛋白含量的 ELISA 检测方法，其特征在于：采用过碘酸钠改良法标记辣根过氧化物酶。

8、按权利要求 1 所述的大豆球蛋白含量的 ELISA 检测方法，其特征在于：酶联免疫方法为双抗体夹心法。

## 一种大豆 11S 球蛋白含量的检测方法

### 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 11S 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 11S 球蛋白含量的方法。

### 背景技术

大豆 11S 球蛋白是大豆的主要抗原蛋白，当其进入幼年动物及疾病导致的免疫力低下和遗传性过敏体质动物体内就会产生免疫反应，其主要临床表现为腹泻。

大豆脱脂后的产品为豆粕，其粗蛋白含量在 46%左右，且约 60%为大豆球蛋白。大豆球蛋白由 7S 球蛋白和 11S 球蛋白组成，后者约占全部球蛋白的 60%。虽然豆粕是重要的蛋白饲料原料，但是由于其抗原蛋白的存在，在一定程度上限制了它在幼年动物日粮中的添加量。由于不同品种、不同来源大豆及不同加工工艺均影响豆粕中抗原蛋白的量，因此不能对大豆抗原蛋白进行有效的定量分析，就不能准确把握豆粕在幼年动物日粮中的安全添加量。建立准确、快速、灵敏和方便的大豆抗原检测方法，对有效监控豆粕中大豆抗原蛋白水平，促进豆粕在幼年动物中的安全使用具有十分重要的现实意义。本发明就是应用 ELISA（酶联免疫吸附测定法）建立大豆 11S 球蛋白的准确、快速、灵敏和方便的定量检测方法。

### 发明内容

在分析比较了间接抑制酶联免疫法检测大豆球蛋白灵敏度不够高的不足后，发明人采用双抗体夹心酶联免疫吸附测定法测定大豆、豆粕及相关产品中大豆 11S 球蛋白的含量。

本发明的目的是这样实现的：以等电点沉淀和凝胶层析等方法纯化的大豆 11S 球蛋白为抗原免疫动物获得抗体，将抗体与辣根过氧化物酶连接作为酶标抗体，再将其用作双抗体夹心 ELISA 检测大豆、豆粕及相关产品中大豆 11S 球蛋白含量。

本发明的优越性：灵敏度高。本发明的大豆 11S 球蛋白的检测限为 2.5 ng，而间接抑制酶联免疫法检测大豆球蛋白的检测限则为 16 ng，此外，常用的 SDS-PAGE 方法只能进行大豆球蛋白的定性检测，不能定量。

### 附图说明

图 1 为双抗体夹心 ELISA 检测标准曲线图。其中，检测孔 OD 值为纵轴，抗原浓度为横轴。

### 具体实施方式

- 1) 脱脂大豆粉在缓冲液 A 中提取得到含大豆球蛋白的溶液，
- 2) 将溶液 pH 调至 6.4 得到沉淀 1 和上清液，
- 3) 将沉淀 1 溶解在缓冲液 B 中，并加固体硫酸铵制得 51-66%硫酸铵沉淀组分，过凝胶过滤柱，得到纯化的大豆球蛋白，
- 4) 用大豆球蛋白免疫动物，获得抗血清，
- 5) 盐析和凝胶过滤层析纯化抗体，检测抗体效价，
- 6) 将纯化抗体与辣根过氧化物酶连接作为酶标抗体，

7) 用双抗体夹心酶联免疫法检测大豆、豆粕及相关产品中大豆 11S 球蛋白含量。

本发明所述的缓冲液 A 为 0.01-0.03mol/L 的 Tris-HCl 的缓冲液, 含 10mmol/L 2-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  $\text{KH}_2\text{PO}_4$ , 32.5 mmol/L  $\text{K}_2\text{HPO}_4$ ), 含 0.4mol/L 的 NaCl, 10mmol/L 2-巯基乙醇, pH7.6。

本发明所述的凝胶过滤介质为 Sepharose CL-6 B。

本发明所述的免疫动物为健康雄性新西兰大白兔。

本发明所述的纯化抗体凝胶介质为 Sephadex G-200。

本发明所述的酶标法采用过碘酸钠改良法标记辣根过氧化物酶。

本发明所述的酶联免疫方法为双抗体夹心酶联免疫法。

详细描述本发明大豆 11S 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 0.01-0.03mol/L, pH8.0 的 Tris-HCl 缓冲液 A 混合, 料水比 1: 15-25, 25-37℃ 提取 1-2 小时。收集上清液 1。将上清液 1 pH 调至 6.4, 5000rpm 离心 20min。得到沉淀 1。

2) 将沉淀 1 用磷酸盐缓冲液 B (含 0.4mol/L 的 NaCl, 10mmol/L 巯基乙醇, pH7.6) 溶解, 加硫酸铵制得 51-66%硫酸铵沉淀组分, 离心收集上清过 Sepharose CL-6 B, 用磷酸盐缓冲液 B (0.26-0.52mmol/L  $\text{KH}_2\text{PO}_4$ , 3.25 mmol/L  $\text{K}_2\text{HPO}_4$ ) 洗脱, 收集对应吸收峰的溶液, 即纯化的大豆 11S 球蛋白。

3) 将纯化的大豆 11S 球蛋白装入截留分子量 8,000-14,000 的透析袋, 对 PBS 缓冲液透析过夜。收集透析液, 浓缩, 小份分装。

4) 取上述纯化浓缩的 11S 球蛋白用 PBS 缓冲液配成 200  $\mu\text{g}/\text{mL}$  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, 免疫部位为背部皮下。两周后用以上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, 免疫部位为背部皮下。再一周后用以上蛋白溶液再次加强免疫, 免疫剂量为 1-1.5mL/只大白兔, 免疫部位为腹腔。琼脂糖双扩或间接 ELISA 检测抗体效价。效价合适后心脏采血收集抗血清。

5) 将收集的抗大豆 11S 球蛋白的抗血清用盐析和凝胶过滤层析法纯化, 再次检测效价后小量分装。

6) 将纯化抗体与辣根过氧化物酶结合制得酶标抗体。

7) 双抗体夹心 ELISA 标准曲线的建立。其方法是: 方阵滴定法检测血清 IgG 最佳浓度包被酶标板, 4℃ 包被过夜, 次日洗板, 然后各孔中加入封闭液 100  $\mu\text{l}$ , 28-37℃ 孵育 30-60 min, 洗板, 然后将大豆 11S 球蛋白分别做 10000、5000、2500、1250、625、312、156、78、39、20、10、5、2.5、1.25、0.625、0.312 ng/mL 的系列稀释, 取 100  $\mu\text{l}$  依次加入酶标板孔中, 每个梯度 3 个重复, 每孔加入最佳稀释度酶标抗体 IgG 各 100  $\mu\text{l}$ , 孵育 1 小时后洗板, 每孔加入 TMB 底物 100  $\mu\text{l}$ , 37℃ 显色 10-30 min 后, 每孔加入 50  $\mu\text{l}$  2 mol/L 的硫酸终止液。然后送入酶标仪中在 450 nm 波长下检测每孔 OD 值。用以上梯度稀释的抗原检测到的 OD 值建立标准曲线: 以检测孔 OD 值为纵轴, 抗原浓度为横轴。

大豆球蛋白的定量检测。按方法 7) 建立标准曲线, 待测蛋白溶液稀释到合适浓度后也按方法 7) 做 3 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、灵敏度极高, 可满足实际生产的检测需求。

## 具体实施方法

按本发明大豆 11S 球蛋白含量的 ELISA 检测方法，具体实施操作步骤如下：

1) 将豆粕粉碎与 0.01-0.03 mol/L, pH8.0 的 Tris-HCl 缓冲液混合，料水比 1: 25, 25℃提取 2 小时。收集上清液。将上清液 pH 调至 6.4, 5000 rpm 离心 20 min。得到沉淀 1。

2) 将沉淀 1 用磷酸盐缓冲液（含 0.4 mol/L 的 NaCl, 10 mmol/L 2-巯基乙醇, pH 7.6）溶解，加硫酸铵制得 51-66 %硫酸铵沉淀组分，离心收集上清过 Sepharose CL-6 B, 用磷酸盐缓冲液（同前）洗脱，收集对应吸收峰的溶液，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 8,000-14,000 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 200 μg/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 1 mL，免疫部位为背部皮下。两周后用以上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 mL/只大白兔，免疫部位为背部皮下。再一周后用以上蛋白溶液再次加强免疫，免疫剂量为 1 mL/只大白兔，免疫部位为腹腔。琼脂糖双扩或间接 ELISA 检测抗体效价。效价合适后心脏采血收集抗血清。

5) 将收集的抗大豆球蛋白的抗血清用盐析和凝胶过滤层析法纯化，间接 ELISA 检测效价后小量分装。

6) 双抗体夹心 ELISA 标准曲线的建立。其方法是：方阵滴定法检测血清 IgG 最佳包被浓度包被酶标板，每孔 100 μl, 4 ℃包被过夜，次日洗板，然后各孔中加入封闭液 100 μl, 28-37 ℃孵育 30-60 min, 洗板，并将大豆球蛋白分别做 10000、5000、2500、1250、625、312、156、78、39、20、10、5、2.5、1.25、0.625、0.312 ng/mL 的系列稀释，取 100 μl 依次加入酶标板孔中，每个梯度 3 个重复，每孔加入最佳稀释度酶标抗体 IgG 各 100 μl, 孵育 1 小时，然后洗板，每孔加入 TMB 底物 100 μl, 37℃显色 15min 后，每孔加入 50 μl 2mol/L 的硫酸终止液。然后送入酶标仪中在 450 nm 波长下检测每孔 OD 值。用以上梯度稀释的抗原检测到的 OD 值建立标准曲线：以检测孔 OD 值为纵轴，抗原浓度为横轴。

7) 大豆 11S 球蛋白的定量检测。按方法 7) 建立标准曲线，待测蛋白溶液稀释到合适浓度后也按方法 7) 做 3 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蛋白溶液的实际浓度。

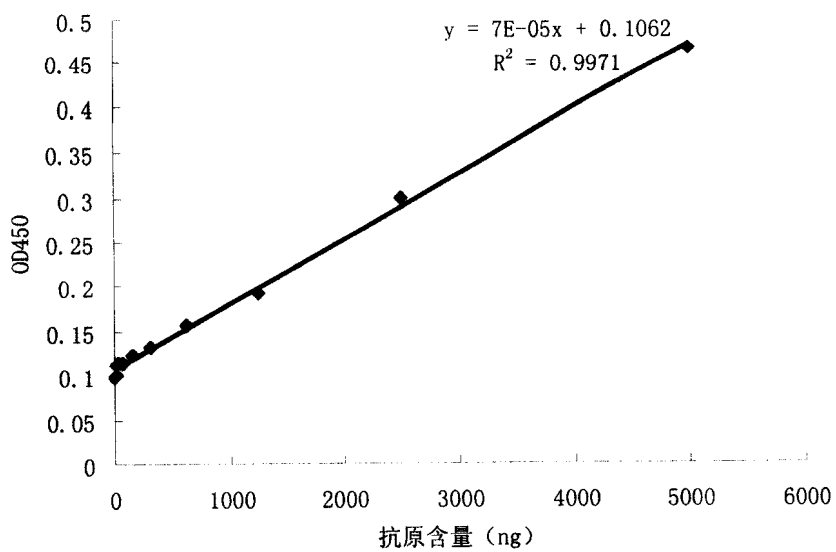


图 1 双抗体夹心 ELISA 检测标准曲线

专利名称(译)	一种大豆11S球蛋白含量的检测方法		
公开(公告)号	<a href="#">CN101482567A</a>	公开(公告)日	2009-07-15
申请号	CN200810246198.6	申请日	2008-12-30
[标]申请(专利权)人(译)	安徽农业大学 安徽天邦饲料科技有限公司 安徽天邦生物技术有限公司		
申请(专利权)人(译)	安徽农业大学 安徽天邦饲料科技有限公司 安徽天邦生物技术有限公司		
当前申请(专利权)人(译)	安徽农业大学 安徽天邦饲料科技有限公司 安徽天邦生物技术有限公司		
[标]发明人	李吕木 韩景华 张邦辉 宋国福		
发明人	李吕木 韩景华 张邦辉 宋国福		
IPC分类号	G01N33/68 G01N33/53		
外部链接	<a href="#">Espacenet</a> <a href="#">SIPO</a>		

**摘要(译)**  
 本发明公开了一种测定检测大豆、豆粕及相关产品中11S球蛋白含量的ELISA方法。本发明采用等电点沉淀与凝胶层析纯化大豆11S球蛋白作为抗原，并免疫动物获得抗血清，然后提取抗大豆球蛋白抗体与辣根过氧化物酶连接作为酶标抗体，用作双抗体夹心酶联免疫法检测大豆、豆粕及相关产品中大豆11S球蛋白的含量。本发明的优越性在于该法检测快速、准确且灵敏度极高。

