



(12) 发明专利申请

(10) 申请公布号 CN 103044549 A

(43) 申请公布日 2013.04.17

(21) 申请号 201210573720.8

C12N 15/12(2006.01)

(22) 申请日 2012.12.26

C12N 15/70(2006.01)

(71) 申请人 浙江大学

G01N 33/68(2006.01)

地址 310027 浙江省杭州市西湖区浙大路
38 号

G01N 33/53(2006.01)

(72) 发明人 沈立荣 李玖璐 王一然 谭量量
金凤 丁美会 陈正贤

(74) 专利代理机构 杭州求是专利事务有限公
司 33200

代理人 张法高

(51) Int. Cl.

C07K 16/18(2006.01)

C07K 16/06(2006.01)

C07K 19/00(2006.01)

权利要求书 1 页 说明书 11 页 附图 2 页

(54) 发明名称

一种中华蜜蜂抗菌肽 AccRoyalisin 多克隆
抗体的制备方法及用途

(57) 摘要

本发明公开了一种中华蜜蜂抗菌肽 AccRoyalisin 多克隆抗体的制备方法及用途。以大肠杆菌重组表达的中华蜜蜂王浆抗菌肽 AccRoyalisin 为抗原,免疫大白兔制备的多克隆抗体,该抗体效价大于 40000 倍;以此多克隆抗体为一抗,以重组表达的 GST-AccRoyalisin 为标准蛋白抗原作倍比稀释,用酶标仪通过 Elisa 法检测不同浓度 GST-AccRoyalisin 蛋白样品的吸光度,建立吸光度与 MRJP1 蛋白浓度的标准曲线。将不同蜂种或不同蜂群的血淋巴、蜂王浆冻干粉稀释后作为抗原,采用 Elisa 法检测得到样品的吸光度,代入所建立的标准曲线,计算得到样品的 Royalisin 的含量。本发明为 Royalisin 抗体提供了一种新的用途,为养蜂领域蜂中和蜂群抗病力的评价、抗病蜂群的选育,为蜂王浆防腐抗菌性能的评价提供了一种快捷的定性定量检测新方法。

1. 一种蜂王浆王浆抗菌肽 AccRoyalisin 抗体的制备方法,其特征在于,步骤如下:

(1)以含中华蜜蜂王浆抗菌肽 AccRoyalisin 基因的该蜂头部 cDNA 为模板,用 PCR 方法扩增出其前体片段,并克隆入含 GST 编码基因的表达载体 pGEX- 4T- 2 中,将筛选获得的重组 pGEX-4T-2/ AccRoyalisin 转化大肠杆菌 BL21 中与谷胱甘肽融合进行表达;用亲和分离方法纯化目标蛋白 GST-Acc Royalisin;

(2)以纯化的 GST-AccRoyalisin 作为抗原,免疫大白兔,取血清获得 GST-AccRoyalisin 多克隆抗体。

2. 一种如权利要求 1 所述的方法制备的 GST-AccRoyalisin 多克隆抗体。

3. 一种如权利要求 2 所述 GST-AccRoyalisin 多克隆抗体检测蜜蜂血淋巴中抗菌肽 Royalisin 含量的 Elisa 方法,其特征在于,

(1)以 GST-AccRoyalisin 多克隆抗体为一抗,以重组表达 GST-AccRoyalisin 为标准抗原蛋白作倍比稀释,用酶标仪通过 Elisa 法,检测不同浓度 GST-AccRoyalisin 蛋白样品的吸光度,建立吸光度与 AccRoyalisin 蛋白浓度的标准曲线;

(2)用中华蜜蜂和意大利蜜蜂血淋巴为抗原,以 GST-AccRoyalisin 多克隆抗体为一抗,采用 Elisa 法检测获得样品的吸光度,代入所建立的标准曲线,计算得到样品的 Royalisin 含量。

4. 一种如权利要求 3 所述的 Elisa 方法应用于测定中华蜜蜂与意大利蜜蜂抗病菌能力的差异。

5. 一种如权利要求 2 所述的 GST-AccRoyalisin 多克隆抗体用于检测蜂王浆中抗菌肽 Royalisin 含量的 Elisa 方法,其特征在于,

(1)以 GST-AccRoyalisin 多克隆抗体为一抗,以重组表达的 GST-AccRoyalisin 为标准抗原蛋白作倍比稀释,用酶标仪通过 Elisa 法,检测不同浓度 GST-AccRoyalisin 蛋白样品的吸光度,建立吸光度与 AccRoyalisin 蛋白浓度的标准曲线;

(2)用蜂王浆冻干粉蛋白抽提物为抗原,以 GST-AccRoyalisin 多克隆抗体为一抗,采用 Elisa 法检测获得样品吸光度,代入所建立的标准曲线,计算得到样品中的 Royalisin 的含量。

6. 一种如权利要求 5 所述的 Elisa 方法应用于测定蜂皇浆防腐性能。

一种中华蜜蜂抗菌肽 AccRoyalisin 多克隆抗体的制备方法 及用途

技术领域

[0001] 本发明涉及基因工程和免疫学领域,特别地,本发明涉及一种用中华蜜蜂 (*Apis cerana cerana*) 王浆抗菌肽 AccRoyalisin 基因融合表达产物 GST-AccRoyalisin 制备的多克隆抗体。更具体地说,本发明涉及 AccRoyalisin 抗体的制备方法,以及用该抗体 Elisa 法检测中华蜜蜂、意大利蜜蜂血淋巴中 Royalisin 含量,作为判断蜂种或蜂群抗病力的依据;以及用该抗体 Elisa 法检测蜂王浆中 Royalisin 含量,作为评价蜂王浆防腐性能的依据。

背景技术

[0002] 蜂王浆是蜜蜂头部王浆腺分泌的生物活性物质,具有促进人体生长发育,抗疲劳、提高免疫力、抗肿瘤、抗炎和抗菌等多种功能,作为人类的营养保健品历史悠久。Royalisin 是蜂王浆中的一种抗菌肽,是蜜蜂受到微生物或其他外源有害物质侵染时由头部或胸部产生的一种低分子肽类。日本学者 Fujiwara 等(Fujiwara, S. et al. J. Biol. Chem., 1990, 265: 11333-11337)最初通过酸处理王浆,从王浆中分离获得了 Royalisin,其分子量为 5523 Da,其一级结构由 51 个氨基酸残基组成,与蜜蜂血淋巴中的 defensin 序列几乎相同,仅第 50 位的氨基酸残基出现变化,由 defensin 中的精氨酸代替了王浆中 Royalisin 中的酪氨酸。Royalisin 没有特异性,诱导产物不仅只对特定微生物,通常对其他微生物也有抗生作用。Bilikova 和 Bachanová 等(Bilikova, K., et al. Apidologie, 2001, 32 : 275-283; Bachanová, K., et al. Apidologie, 2002, 33 : 259-269.)对从天然王浆中分离的 Royalisin 进行相应的抑菌试验,证实该多肽对革兰氏阳性细菌蜜蜂幼腐病菌 (*Paenibacillus larvae larvae*) 有很强的抑菌作用,在低至 1 μ M 的浓度下也具有抑菌作用;对革兰氏阳性细菌枯草芽孢杆菌 (*Bacillus subtilis*) 和藤黄八叠球菌 (*Sarcina lutea*),包括灰霉菌 *Botrytis cinerea* 也有很好的抑菌作用,但对革兰氏阴性细菌无作用。

[0003] 在目前全世界已报道的 9 个蜜蜂属 (*Apis*) 成员中,只有西方蜜蜂 (*Apis mellifera*) (其中分布最广的为意大利蜜蜂 *A. mellifera mellifera*, 简称意蜂) 和东方蜜蜂 (*A. cerana*) 得到人工驯化和规模化人工养殖,并用于蜂蜜生产。相对于西方蜜蜂来说,东方蜜蜂 (*A. cerana*),包括我国特有的亚种中华蜜蜂 (*A. cerana cerana*, 简称中蜂) 因生产性能较低,蜂群数量在原产地正处于萎缩状态。但国内外研究表明,因中华蜜蜂因长期适应于我国地理气候环境,具有西方蜜蜂所不具备的抗病性、耐寒性等抗逆性能,其生物学特点也非常不同于前者,在蜜蜂育种和生态多样性保护等方面具有非常重要的利用价值。因为抗菌肽在蜜蜂的自身防御系统里起着不可替代的作用。蜂螨和近年来爆发的蜜蜂崩塌病对西方蜜蜂危害十分严重,蜂病防治受到各国的高度重视,很多蜜蜂专家已在选育抗病品种作为最重要的防治手段方面开展了大量研究。近年国内学者 (Xu, P., et al. PLoS ONE. 2009, 4: 1-9.) 研究表明,包括中华蜜蜂亚种在内的东方蜜蜂 (*Apis cerana*) 之所以抗病性优于意大利蜜蜂在内的西方蜜蜂,与其分泌抗菌肽能力强、种类多密切相关。

[0004] 目前国际上已发现的抗菌肽分为四大类：(a) cecropins, (b) defensins 或 sapecins, (c) attacin-like proteins, (d) proline-rich peptides。Defensins 是昆虫抗菌肽中最的一类, 它包括了三个亚类: 精典 defensins, β -defensins 和昆虫 defensins。Royalisin 属于昆虫 defensins 亚类。昆虫 defensins 亚类一般由 36-51 个氨基酸残基组成, 三对二硫键, 一个 α -折叠、两个 β 折叠和一个 N-端环组成的稳定结构, 均具有抗革兰氏阳性细菌的活性 (Cho, W. L., et al Insect Biochem. Molec. Biol. 1996, 26: 395-402)。

[0005] 中蜂与意蜂的 Royalisin 氨基酸组成有 95% 以上的同源性。目前对 Royalisin, 除了西方蜜蜂的 Royalisin 基因序列和氨基酸序列有报道, 从天然王浆中分离的 Royalisin 进行了抑菌试验外, 目前国内外尚未见利用 Royalisin 抗体检测蜜蜂蜂种和蜂群血淋巴中 Royalisin 含量, 以及蜂王浆中 Royalisin 含量, 作为评价蜂种和蜂群抗病力、蜂王浆防腐性能的依据的报道。

发明内容

[0006] 本发明的目的在于针对现有技术的不足, 提供一种中华蜜蜂王浆抗菌肽 AccRoyalisin 基因重组表达产物制备多克隆抗体的方法及用途。

[0007] 本发明的目的是通过以下技术方案来实现的:

一种蜂王浆王浆抗菌肽 AccRoyalisin 抗体的制备方法, 步骤如下:

(1) 以含中华蜜蜂王浆抗菌肽 AccRoyalisin 基因的该蜂头部 cDNA 为模板, 用 PCR 方法扩增出其前体片段, 并克隆入含 GST 编码基因的表达载体 pGEX-4T-2 中, 将筛选获得的重组 pGEX-4T-2/AccRoyalisin 转化大肠杆菌 BL21 中与谷胱甘肽融合进行表达; 用亲和分离方法纯化目标蛋白 GST-Acc Royalisin;

(2) 以纯化的 GST-AccRoyalisin 作为抗原, 免疫大白兔, 取血清获得 GST-AccRoyalisin 多克隆抗体。

[0008] 所述的方法制备的 GST-AccRoyalisin 多克隆抗体。

[0009] 所述的 GST-AccRoyalisin 多克隆抗体检测蜜蜂血淋巴中抗菌肽 Royalisin 含量的 Elisa 方法,

(1) 以 GST-AccRoyalisin 多克隆抗体为一抗, 以重组表达 GST-AccRoyalisin 为标准抗原蛋白作倍比稀释, 用酶标仪通过 Elisa 法, 检测不同浓度 GST-AccRoyalisin 蛋白样品的吸光度, 建立吸光度与 AccRoyalisin 蛋白浓度的标准曲线;

(2) 用中华蜜蜂和意大利蜜蜂血淋巴为抗原, 以 GST-AccRoyalisin 多克隆抗体为一抗, 采用 Elisa 法检测获得样品的吸光度, 代入所建立的标准曲线, 计算得到样品的 Royalisin 含量。

[0010] 所述的 Elisa 方法应用于测定中华蜜蜂与意大利蜜蜂抗病菌能力的差异。

[0011] 所述的 GST-AccRoyalisin 多克隆抗体用于检测蜂王浆中抗菌肽 Royalisin 含量的 Elisa 方法,

(1) 以 GST-AccRoyalisin 多克隆抗体为一抗, 以重组表达的 GST-AccRoyalisin 为标准抗原蛋白作倍比稀释, 用酶标仪通过 Elisa 法, 检测不同浓度 GST-AccRoyalisin 蛋白样品的吸光度, 建立吸光度与 AccRoyalisin 蛋白浓度的标准曲线;

(2) 用蜂王浆冻干粉蛋白抽提物为抗原,以 GST-AccRoyalisin 多克隆抗体为一抗,采用 Elisa 法检测获得样品吸光度,代入所建立的标准曲线,计算得到样品中的 Royalisin 的含量。

[0012] 所述的 Elisa 方法应用于测定蜂皇浆防腐性能。

[0013] 本发明的有益效果是:

(1) 本发明首次用中华蜜蜂王浆抗菌肽 AccRoyalisin 的基因重组融合表达产物制备出效价较高的多克隆抗体。

[0014] (2) 建立以 Royalisin 抗菌肽作为鉴别蜂王浆真伪和质量的新指标,可填补现行蜂王浆国家标准的不足。因为现行蜂王浆国家标准(GB 9697-2008)以王浆酸 10-HDA 为蜂王浆的特有活性成分,也是国际贸易中衡量蜂王浆质量及真伪的关键指标。但 Antinelli 等(Antinelli, et al. 2003, Food Chem, 80: 85-89)研究表明:10-HDA 在 -18°C 、 4°C 和室温条件下贮藏 12 个月,其含量分别只减少 0.1%、0.2% 和 0.4%,非常稳定,即使在高温下也仅有少量降解。因此,不适合作为蜂王浆新鲜度以及品质的指标。

[0015] (3) 本发明为蜂王浆中 Royalisin 含量的测定提供了一种简便易行、准确度高的 Elisa 快速测定方法。Elisa 法作为一种抗原抗体的定量分析法,由于酶的催化效率很高,可极大地放大反应效果,从而使测定方法达到很高的灵敏度。同时,该方法操作简单,方便迅速,成本低廉,用此方法检测蜂王浆质量十分可行。

附图说明

[0016] 图 1 是 AccRoyalisin 基因在大肠杆菌中的融合表达产物 GST-AccRoyalisin 的 SDS-PAGE 电泳图。其中泳道 1-3 为阳性克隆菌液诱导产物上清(可溶性蛋白); 泳道 M 为蛋白标准; 泳道 7-9 为阳性克隆菌液诱导产物沉淀(包涵体蛋白); 泳道 10: 含空表达载体的菌液诱导产物沉淀(包涵体蛋白)。GST-AccRoyalisin 蛋白用箭头标出。

[0017] 图 2 是通过亲和分离的重组融合表达产物 GST-AccRoyalisin 的 SDS-PAGE 电泳图。其中泳道 M 为蛋白标准,泳道 M 为蛋白标准,泳道 3-7 为纯化得到的洗脱峰,泳道 9 为流出峰。

[0018] 图 3 为以重组 GST-AccRoyalisin 抗体为一抗,以纯化的重组 GST-AccRoyalisin 为标准抗原,经梯度稀释,采用 Elisa 法测定 450 nm 处的测吸光值。以吸光值 OD_{450} 为纵坐标, GST-AccRoyalisin 标准溶液浓度为横坐标,绘制成的标准曲线: $y=0.017x+0.067$, $R^2=0.998$ 。

[0019] 图 4 为以 GST-AccRoyalisin 抗体为一抗,分别以中蜂和意蜂工蜂血淋巴为抗原,采用 Elisa 法测定两种蜜蜂血淋巴中 Royalisin 含量的结果比较。纵坐标为每 μl 蜜蜂血淋巴中的 Royalisin 含量,横坐标为蜜蜂接种大肠杆菌后的时间(小时)。

具体实施方式

[0020] 本发明公开了利用大肠杆菌重组表达的中华蜜蜂(*Apis cerana cerana*)王浆抗菌肽 AccRoyalisin 为抗原,免疫大白兔制备多克隆抗体,再以此多克隆抗体为一抗,以重组表达 GST-AccRoyalisin 为标准蛋白为抗原作倍比稀释,用酶标仪通过 Elisa 法,检测不同浓度 GST-AccRoyalisin 蛋白样品的吸光度,建立吸光度与 GST-AccRoyalisin 蛋白浓度

的标准曲线。将不同蜂种或蜂群的血淋巴、蜂王浆冻干粉稀释,作为抗原,采用 Elisa 法检测获得样品吸光度,代入所建立的标准曲线,计算得到样品中的 Royalisin 的含量。

[0021] 1、蜂王浆王浆抗菌肽 AccRoyalisin 抗体的制备方法和步骤、使用方法如下:

(1) 以含中华蜜蜂王浆抗菌肽 AccRoyalisin 基因(GenBank 接受号: EF660337) 的该蜂头部 cDNA 文库质粒为模板, 用 PCR 方法扩增出其前体片段, 并克隆入表达载体 pGEX- 4T- 2 中,将筛选获得的重组 pGEX-4T-2/ Accroyalisin 转化大肠杆菌 BL21 中与谷胱甘肽 (GST) 融合进行表达。中蜂王浆抗菌肽 AccRoyalisin 和 AccRoyalisin 前体与西方蜜蜂抗菌肽 AmRoyalisin 前体的均由 95 个氨基酸残基组成,同源性的为 90%-92%; 两者的成熟肽均由 51 个氨基酸残基组成,只有 3-4 个氨基酸残基不同,同源性在 90% 以上。

[0022] 对重组菌进行培养和诱导表达。细菌总蛋白经 SDS-PAGE 电泳显示, 与含 pGEX-4T-2 空载体的 BL21 菌体相比, pGEX-4T-2/ Acc- royalisin 工程菌具有大小约 36 ku 的特异性条带 (图 1)。Acc-royalisin 理论分子质量为 5. 52 kDa, 加上 pGEX-4T-2 载体中与其融合表达的、质量为 26 kDa 的 GST 蛋白, 预期 GST-A ccRoyalisin 融合蛋白质量为 31.2 kDa, 因此, 该特异性蛋白与其预期蛋白分子量相符。进一步对重组表达产物进行超声波破碎和离心处理, 对获得的上清和沉淀分别进行 SDS-PAGE 电泳分析, 二者均显示出清晰的目的蛋白, 显示表达产物以可溶性蛋白和包涵体蛋白 2 种形式存在, 其中具有生物活性,可直接通过亲和纯析方法分离的可溶性蛋白占大部分。将此 SDS-PAGE 电泳胶上的 GST-AccRoyalisin 融合蛋白的转印到硝酸纤维素膜,用 GST 抗体作 Western blot 分析,显示特异性印迹。

[0023] (2) 将筛选得到的含 AccRoyalisin 的重组菌接种 LB 液体培养基,37℃ IPTG 诱导表达 12 小时。将 500 mL 菌液转移至离心管,离心 10 min (5000 rpm,4 ℃),去上清,沉淀置于冰上。每 1 mL 原培养液用 50 μ L 冰浴 PBS 完全悬浮沉淀。在冰上用超声波短时破碎细胞直至样品不黏稠。用超声破碎后的菌液于 10,000 rpm,4 ℃离心 10 min。小心地将上清转移至一个用冰预冷的干净小管中。细胞沉淀再用冰浴 PBS 完全悬浮(每 1 mL 原培养液用 50 μ L 冰浴 PBS)。

[0024] 通过连接于 AKTA explorer 100 的含 GST 抗体的亲和层析预装柱进行目标蛋白分离。以紫外 A₂₈₀ nm 的吸收峰作为蛋白的检测工具。过柱前样品须离心或 0.45 μ m 过滤器。样品太粘稠,可用结合缓冲液稀释。

[0025] 操作时水与缓冲液须用高纯水,缓冲液须过 0.45 μ m 过滤器,然后超声脱气。结合缓冲液注入到注射器或水泵管中,连接柱子和注射器防止空气进柱。移去柱底出口处的小头。用 5 倍柱床体积的结合缓冲液平衡柱子。用注射器或泵进样,建议进样流速:0.2-1 mL/min。用 5-10 倍柱体积结合缓冲液清洗柱子或者清洗至流出液中无紫外吸收峰,流速为 1-2 mL/min。用 5-10 倍柱体积洗脱缓冲液洗脱,流速为 1-2 mL/min。当洗脱峰出现时,收集洗脱液。

[0026] 取亲和分离的洗脱峰,作 SDS-PAGE 电泳分析,结果(见图 2)显示,从图中洗脱峰和流出峰的蛋白电泳结果看,从该纯化体系得到的洗脱峰为分子量大小 32 kDa 左右的单一条带蛋白,与目的蛋白大小一致,表明纯化后得到单一目的蛋白。流出峰含有多条蛋白条带,属于混合蛋白,与峰形图一致。流出峰中同样有目的蛋白条带,说明部分目的蛋白未能及时与柱子结合而直接以流出液形式流出。

[0027] (3) 取经 AKTA 过柱纯化洗脱得到的 GST-AccRoyalisin, 装入透析袋中, 透析过夜, 将透析脱盐溶液转入 1.5 mL eppendorf 管中, 冷冻干燥, 用 0.9% 的生理盐水溶解纯化的蛋白, 作为抗原备用。

[0028] 2、多克隆抗体 GST-AccRoyalisin 制备

选取 14-16 周龄的健康雄性家兔 2 只, 采用皮下注射法, 每只注射 0.5 mL 左右纯化的融合蛋白抗原。免疫前, 从兔耳抽取血样, 作为阴性对照。将融合蛋白抗原溶于 700 μ L 生理盐水, 加 700 μ L 弗氏完全佐剂和适量青霉素、链霉素溶液乳化, 皮下多点注射免疫。3 周后, 用同样的抗原和佐剂及青霉素乳化液, 作一次加强免疫。5 周后, 融合蛋白抗原溶于 1 mL 生理盐水肌肉注射免疫; 6 周后, 再次用 1 mL 溶有融合蛋白抗原的生理盐水加强免疫。同时, 从兔耳抽血样, 采用间接 ELISA 方法进行多抗血清效价测定; 7 周后, 颈动脉收集血液, 置室温下使其凝固。将凝固的血液放入 37 $^{\circ}$ C 温箱内半小时, 再置 4 $^{\circ}$ C 冰箱过夜, 使血块收缩, 抗血清析出; 吸出抗血清, 3,000 rpm 离心 10 min, 吸上清液分装, -80 $^{\circ}$ C 保存备用。

[0029] 3、利用 Elisa 方法测定蜜蜂工蜂血淋巴中 Royalisin 含量

(3.1) 包被: 分别用权利要求 1 所述重组 GST-AccRoyalisin 作为抗原, 用碳酸盐缓冲液 (CBS, Na_2CO_3 1.59g, NaHCO_3 2.93g, ddH_2O 950 mL, 调节 pH 值至 9.6, 加 ddH_2O 定容至 1000 mL, 4 $^{\circ}$ C 保存) 将 10 μ g/mL 的 AccRoyalisin 标准蛋白溶液, 按倍比梯度稀释法加样于 96 孔板, 每孔加 100 μ L/孔, 4 $^{\circ}$ C 包被过夜;

(3.2) 封闭: 次日弃酶联板小孔中的包被液, 以 PBST (PBS+0.05% Tween-20) 为洗涤液, 每步洗涤 5-10 次, 并拍干。然后加 100 μ L 含 5% BSA 或者脱脂奶粉的 PBST 溶液中 37 $^{\circ}$ C 封闭 1.5 h;

(3.3) 弃酶联板小孔中的封闭液, 并用 PBST 洗涤。加入一抗, 用磷酸盐缓冲液 (PBS, KH_2PO_4 0.27g, Na_2HPO_4 1.42g, NaCl 8g, KCl 0.2g, ddH_2O 800mL, 用浓盐酸调 pH 至 7.4, ddH_2O 定容到 1L) 稀释 1000 倍, 100 μ L/孔, 37 $^{\circ}$ C 静置 1-2 h;

(3.4) 洗涤: 用自来水冲洗 10 次, 拍干;

(3.5) 弃酶联板小孔中的一抗, 并用 PBST 洗涤以 HRP 标记的羊抗兔 IgG 为二抗, 稀释 5000 倍, 100 μ L/孔, 37 $^{\circ}$ C 静置 1 h;

(3.6) 洗涤: 用自来水冲洗 10 次, 拍干;

(3.7) 液, 50 μ L/孔, 加完立即在酶标仪上测量波长 450 nm 的吸光值 (450 nm 为该显色剂的最大吸收波长);

(3.8) 用抗体检测得表 1。以 OD_{450} 吸光值平均值 ($n=3$) 为纵坐标, GST-AccRoyalisin 标准蛋白溶液浓度为横坐标, 得到标准曲线 (图 3): $y = 0.017x + 0.067$, $R^2=0.998$ 。

[0030] 表 1 用 GST-AccRoyalisin 抗体测定梯度稀释标准多肽的得到的吸光度

多肽浓度 ($\mu\text{g/ml}$)	0.5	0.8	1.0	3.0	5.0	8.0	10.0
	0.0843	0.0815	0.0871	0.138	0.1555	0.244	0.2723
吸光值 (OD_{450})	0.0737	0.0739	0.0885	0.1288	0.1527	0.1741	0.2142
	0.0705	0.0808	0.0845	0.0981	0.1531	0.1901	0.2397
平均值	0.07617	0.0787	0.0867	0.1216	0.1538	0.2027	0.2421

(3.9) 采集蜜蜂和染菌处理

从养蜂场随机各挑一个中华蜜蜂和意大利蜜蜂蜂箱,分别巢脾,用广口瓶随机取 100 只左右工蜂。分为三组:

① 不处理组:各取中蜂、意蜂工蜂 30 只。

[0031] ②各取中蜂、意蜂工蜂 60 只,用 CO_2 麻醉后,每只工蜂在腹部注射 50cfu/g 的大肠杆菌 2 μl 染菌,然后置养虫笼内,用 10% 的蜂蜜水饲养,隔离 24 小时回捕。

[0032] ③各取中蜂、意蜂工蜂 60 只,用 CO_2 麻醉后,每只工蜂在腹部注射 50 cfu/mL 的大肠杆菌 2 μl 染菌,然后置养虫笼内,用 10% 的蜂蜜水饲养,隔离 48 小时回捕。

[0033] (3.10) 提取蜜蜂血淋巴

分别从上述三组蜜蜂中随机采集中蜂和意蜂 15 头,以 5 头蜜蜂为 1 个样本,各设 3 次重复。用剪刀切开蜜蜂颈部背面,让血淋巴自动涌出,用毛细管吸取,将收集的血淋巴加入离心管,同时加入微量苯基硫脲,防止血浆中苯酚基氧化酶活化使血淋巴黑化,离心除去血细胞。取上清备用。

[0034] (3.11)分别吸取中蜂和意蜂血淋巴 10 μL ,加入 PBS 990 μL ,摇匀,配成浓度为 10 $\mu\text{g/ml}$ 的溶液,每孔加 100 μL /孔。按以上 Elisa 方法,分别测定中蜂和意蜂血淋巴的吸光值(OD_{450})值,结果见表 3。将各吸光值代入实施例 4 中的标准曲线 $y = 0.017x + 0.067$ 的 Y 项,换算得到血淋巴中抗菌肽含量(X)。

[0035] 表 2 用 GST-AccRoyalisin 抗体测定中蜂和意蜂血淋巴中抗菌肽含量结果

	接菌后时间(h)		I	II	III	平均值
	0	吸光值	0.1883	0.1861	0.1865	
		含量($\mu\text{g}/\mu\text{L}$)	7.1353	7.0059	7.0294	7.06 ± 0.07
中蜂	24	吸光值	0.2043	0.2122	0.2107	
		含量($\mu\text{g}/\mu\text{L}$)	8.0765	8.5412	8.4529	8.36 ± 0.25
	48	吸光值	0.2437	0.2462	0.2461	
		含量($\mu\text{g}/\mu\text{L}$)	10.3941	10.541	10.5353	10.49 ± 0.08
	0	吸光值	0.1606	0.1619	0.1659	
		含量($\mu\text{g}/\mu\text{L}$)	5.5059	5.5824	5.8176	5.64 ± 0.16
意蜂	24	吸光值	0.1717	0.1702	0.1799	

		含量($\mu\text{g}/\mu\text{L}$)	6.1588	6.0706	6.6412	6.29 $\pm$ 0.32
	48	吸光值	0.2091	0.2029	0.2017	
		含量($\mu\text{g}/\mu\text{L}$)	8.3588	7.9941	7.9235	8.09 $\pm$ 0.23

将表2结果作t检验,并作图分析(图4),结果显示中蜂血淋巴中抗菌肽含量在接菌前、接菌24小时后和48小时后均极显著地高于意蜂($p<0.01$)。表明中蜂对致病菌的抗病免疫力高于意蜂。同时,接菌免疫24小时后和48小时后,中蜂和意蜂血淋巴中的抗菌肽含量均显著提高,表现出明显的免疫应答。且中蜂的免疫应答比意蜂强。这对之前国内学者(Xu, P., et al. *PLoS ONE*. 2009, 4:1-9.)关于中蜂西方抗菌肽能力高于意蜂的报道作了很好的验证。因此,GST-AccRoyalisin 抗体适合于评价蜂种和蜂群的抗病力。

[0036] 4、利用 Elisa 间接法测定蜂王浆中 Royalisin 的含量

称取蜂王浆冻干粉 1.5 mg,用 1 ml PBS 溶解,摇匀,配成浓度为 1.5 mg/ml 的溶液,经高速离心,取上清为抗原,稀释 10 倍,加样于 96 孔板,每孔加 10 μL /孔,按以上 Elisa 方法,用 GST-AccRoyalisin 抗体作为一抗,测定吸光值(OD_{450})值,结果见表 3。将各吸光值代入标准曲线 $y = 0.017x + 0.067$ 的 Y 项,换算得到蜂王浆冻干粉中抗菌肽平均含量(X)为 $0.49 \pm 0.23 \mu\text{g}/\mu\text{L}$,即 $100 \times 0.49/15 = 3.3\%$ 。

[0037] 表 3 蜂王浆中 Royalisin 的含量测定结果(n=3)

	1	2	3	平均
OD 值	0.0789	0.0758	0.0713	
抗菌肽含量 ($\mu\text{g}/15\mu\text{g}$)	0.70	0.52	0.25	0.49 ± 0.23
抗菌肽含量 (%)	4.67	3.45	1.69	3.27 ± 1.50

下面结合具体实施例和附图,进一步阐述本发明。应理解,这些实施例仅用于说明本发明而并不用于限制本发明范围。

[0038] 实施例 1 AccRoyalisin 基因的重组表达及融合表达产物的分离纯化

1. AccRoyalisin 基因的重组表达和鉴定

以含中华蜜蜂王浆抗菌肽 AccRoyalisin 基因(GenBank 接受号: EF660337)的该蜂头部 cDNA 文库质粒为模板,用 PCR 方法扩增出其前体片段,并克隆入表达载体 pGEX-4T-2 中,将筛选获得的重组 pGEX-4T-2/ Accroyalisin 转化大肠杆菌 BL21 中与谷胱甘肽(GST)融合进行表达。中蜂王浆抗菌肽 AccRoyalisin 和 AccRoyalisin 前体与西方蜜蜂抗菌肽 AmRoyalisin 前体的均由 95 个氨基酸残基组成,同源性的 90%-92%;两者的成熟肽均由 51 个氨基酸残基组成,只有 3-4 个氨基酸残基不同,同源性在 90% 以上。

[0039] 对重组菌进行培养和诱导表达。细菌总蛋白经 SDS-PAGE 电泳显示,与含 pGEX-4T-2 空载体的 BL21 菌体相比, pGEX-4T-2/ Acc-royalisin 工程菌具有大小约 36 ku 的特异性条带(图 1)。Acc-royalisin 理论分子质量为 5.52 kDa,加上 pGEX-4T-2 载体中与其融合表达的、质量为 26 kDa 的 GST 蛋白,预期 GST-A ccRoyalisin 融合蛋白质量为 31.2 kDa,因此,该特异性蛋白与其预期蛋白分子量相符。进一步对重组表达产物进行超声波破碎和离心处理,对获得的上清和沉淀分别进行 SDS-PAGE 电泳分析,二者均显示出清晰的目的蛋白,显示表达产物以可溶性蛋白和包涵体蛋白 2 种形式存在,其中具有生物活性,可直接通过亲和纯析方法分离的可溶性蛋白占大部分。将此 SDS-PAGE 电泳胶上的 GST-AccRoyalisin 融合蛋白的转印到硝酸纤维素膜,用 GST 抗体作 Western blot 分析,显示特异性印迹。

[0040] 2. 重组融合表达产物 GST-AccRoyalisin 的亲分离

将筛选得到的含 AccRoyalisin 的重组菌接种 LB 液体培养基, 37℃ IPTG 诱导表达 12 小时。将 500 mL 菌液转移至离心管, 离心 10 min (5000 rpm, 4℃), 去上清, 沉淀置于冰上。每 1 mL 原培养液用 50 μ L 冰浴 PBS 完全悬浮沉淀。在冰上用超声波短时破碎细胞直至样品不黏稠。用超声破碎后的菌液于 10,000 rpm, 4℃离心 10 min。小心地将上清转移至一个用冰预冷的干净小管中。细胞沉淀再用冰浴 PBS 完全悬浮(每 1 mL 原培养液用 50 μ L 冰浴 PBS)。

[0041] 通过连接于 AKTA explorer 100 的含 GST 抗体的亲和层析预装柱进行目标蛋白分离。其原理是: 目的蛋白带 GST 标签, 在平衡缓冲液环境下能与 GST 亲和柱结合, 不含 GST 标签的蛋白会被以流出峰的形式被洗脱。洗脱时, 收集得到的洗脱液就是纯化的单一目的蛋白的盐溶液。以紫外 A_{280} nm 的吸收峰作为蛋白的检测工具。过柱前样品须离心或 0.45 μ m 过滤器。样品太粘稠, 可用结合缓冲液稀释。

[0042] 操作时水与缓冲液须用高纯水, 缓冲液须过 0.45 μ m 过滤器, 然后超声脱气。结合缓冲液注入到注射器或水泵管中, 连接柱子和注射器防止空气进柱。移去柱底出口处的小头。用 5 倍柱床体积的结合缓冲液平衡柱子。用注射器或泵进样, 建议进样流速: 0.2-1 mL/min。用 5-10 倍柱体积结合缓冲液清洗柱子或者清洗至流出液中无紫外吸收峰, 流速为 1-2 mL/min。用 5-10 倍柱体积洗脱缓冲液洗脱, 流速为 1-2 mL/min。当洗脱峰出现时, 收集洗脱液。

[0043] 取亲和分离的洗脱峰, 作 SDS-PAGE 电泳分析, 结果(见图 2)显示, 从图中洗脱峰和流出峰的蛋白电泳结果看, 从该纯化体系得到的洗脱峰为分子量大小 32 kDa 左右的单一条带蛋白, 与目的蛋白大小一致, 表明纯化后得到单一目的蛋白。流出峰含有多条蛋白条带, 属于混合蛋白, 与峰形图一致。流出峰中同样有目的蛋白条带, 说明部分目的蛋白未能及时与柱子结合而直接以流出液形式流出。

[0044] 实施例 2 GST-AccRoyalisin 多克隆抗体制备

取经 AKTA 过柱纯化洗脱得到的 GST-AccRoyalisin, 装入透析袋中, 透析过夜, 将透析脱盐溶液转入 1.5 mL eppendorf 管中, 冷冻干燥, 用 0.9% 的生理盐水溶解纯化的蛋白, 作为抗原备用。

[0045] 选取 14-16 周龄的健康雄性家兔 2 只, 采用皮下注射法, 每只注射 0.5 mL 左右纯化的融合蛋白抗原。免疫前, 从兔耳抽取血样, 作为阴性对照。将融合蛋白抗原溶于 700 μ L 生理盐水, 加 700 μ L 弗氏完全佐剂和适量青霉素、链霉素溶液乳化, 皮下多点注射免疫。3 周后, 用同样的抗原和佐剂及青霉素乳化液, 作一次加强免疫。5 周后, 融合蛋白抗原溶于 1 mL 生理盐水肌肉注射免疫; 6 周后, 再次用 1 mL 溶有融合蛋白抗原的生理盐水加强免疫。同时, 从兔耳抽血样, 采用间接 ELISA 方法进行多抗血清效价测定; 7 周后, 颈动脉收集血液, 置室温下使其凝固。将凝固的血液放入 37℃温箱内半小时, 再置 4℃冰箱过夜, 使血块收缩, 抗血清析出; 吸出抗血清, 3,000 rpm 离心 10 min, 吸上清液分装, -80℃保存备用。

[0046] 实施例 3 Elisa 法检测 GST-AccRoyalisin 多克隆抗体效价

用实施例 1 所分离的重组 GST-AccRoyalisin 为抗原, 以实施例 2 制备的 GST-AccRoyalisin 抗体为一抗, 按以下步骤操作:

(1) 包被：分别用实施例 1 所述重组 GST-AccRoyalisin 作为抗原，用碳酸盐缓冲液 (CBS, Na_2CO_3 1.59g, NaHCO_3 2.93g, ddH_2O 950 ml, 调节 pH 值至 9.6, 加 ddH_2O 定容至 1000 ml, 4℃ 保存) 稀释为 1 $\mu\text{g}/\text{ml}$, 100 μl /孔加入 96 孔板中, 4℃ 过夜;

(2) 封闭：次日弃酶联板小孔中的包被液, 以 PBST (PBS+0.05% Tween-20) 为洗涤液, 每步洗涤 5-10 次, 并拍干。然后加 100 μL 含 5% BSA 或者脱脂奶粉的 PBST 溶液中 37℃ 封闭 1.5 h。

[0047] (3) 弃酶联板小孔中的封闭液, 并用 PBST 洗涤。加入一抗, 用磷酸盐缓冲液 (PBS, KH_2PO_4 0.27g, Na_2HPO_4 1.42g, NaCl 8g, KCl 0.2g, ddH_2O 800mL, 用浓盐酸调 pH 至 7.4, ddH_2O 定容到 1L) 稀释 1000 倍, 100 μL /孔, 37℃ 静置 1-2 h。阴性对照与阳性抗血清同样比例稀释。设不加一抗的空白对照组。

[0048] (4) 洗涤：用自来水冲洗 10 次, 拍干。

[0049] (5) 弃酶联板小孔中的一抗, 并用 PBST 洗涤以 HRP 标记的羊抗兔 IgG 为二抗, 稀释 5000 倍, 100 μl /孔, 37℃ 静置 1 h。

[0050] (6) 洗涤：用自来水冲洗 10 次, 拍干;

(7) 以 TMB 为显色底物, 100 μl /孔, 37℃ 放置 15 min; 以 2 M H_2SO_4 为终止液, 50 μl /孔, 加完立即在酶标仪上测量波长 450 nm 的吸光值。450 nm 为该显色剂的最大吸收波长。

[0051] (8) 求出样品 OD 值的平均值 P, 阴性对照 OD 值 N, 若 $P \geq 2N$, 则视为阳性反应, 否则为阴性反应。

[0052] 根据表 4 测定结果表明, 所制备的 GST-AccRoyalisin 多克隆效价高于 40000 倍。

[0053] 表 4 Elisa 测定 GST-AccRoyalisin 多克隆抗体对标准多肽的效价 (n=6)

抗体稀释倍数	1	2	3	平均值
5000	2.7566	2.9229	2.8987	$0.8389 \pm 0.0069^{**}$
10000	2.3228	3.1097	2.9991	$0.6189 \pm 0.0076^{**}$
15000	3.0539	3.0255	3.1185	$0.4528 \pm 0.0008^{**}$
20000	2.8319	3.1513	2.8339	$0.3568 \pm 0.0017^{**}$
40000	1.2354	1.4088	1.5779	$0.2444 \pm 0.0059^{**}$
对照	0.9020	0.8233	0.9516	0.1811 ± 0.0058

$p < 0.00001$, **: 表示与对照相比有极显著差异 $p < 0.01$

实施例 4 AccRoyalisin 标准曲线的建立

将亲和分离得到的 GST-AccRoyalisin 标准蛋白溶于 CBS 中, 配成 10 $\mu\text{g}/\text{ml}$ 的溶液。将 GST-AccRoyalisin 多克隆抗体按 1: 1000 的比例稀释, 作为一抗; 以 HRP 标记的羊抗兔 IgG 为酶标二抗, 按 1: 5000 加入 PBS 中, 配成二抗溶液。

[0054] 将 10 $\mu\text{g}/\text{ml}$ 的 AccRoyalisin 标准蛋白溶液, 按倍比梯度稀释法加样于 96 孔板, 每孔加 100 μl /孔, 4℃ 包被过夜。弃孔中液体, 用 PBST 缓冲液洗 5 遍, 以 200 μl /孔的量加入脱脂牛奶封闭液, 37℃ 封闭 1.5 h。弃脱脂牛奶封闭液, 用 PBST 缓冲液洗 5 遍, 以 100 μl /孔的量, 分别加入一抗抗体、二抗抗体溶液, 37℃ 反应 1 h。弃一抗溶液, 用 PBST 缓冲液洗涤 5 次, 以 100 μl /孔的量加入二抗溶液, 37℃ 反应 0.5 h。弃二抗溶液, 用 PBST 缓冲液洗涤 5 次, 以 100 μl /孔的量加入显色液 TMB, 37℃ 反应 15 min, 以 50 μl /孔的量加 TMB 终止液 2M H_2SO_4 。立即置于酶标仪上, 测定 450 nm 处的测吸光值。

[0055] (1) 用抗体检测得表 1。以 OD_{450} 吸光值平均值 (n=3) 为纵坐标, GST-AccRoyalisin 标准蛋白溶液浓度为横坐标, 得到标准曲线 (图 3): $y = 0.017x + 0.067$, $R^2 = 0.998$ 。

[0056] 表 1 用 GST-AccRoyalisin 抗体测定梯度稀释标准多肽的得到的吸光度

多肽浓度 ($\mu\text{g/ml}$)	0.5	0.8	1.0	3.0	5.0	8.0	10.0
	0.0843	0.0815	0.0871	0.138	0.1555	0.244	0.2723
吸光值 (OD_{450})	0.0737	0.0739	0.0885	0.1288	0.1527	0.1741	0.2142
	0.0705	0.0808	0.0845	0.0981	0.1531	0.1901	0.2397
平均值	0.07617	0.0787	0.0867	0.1216	0.1538	0.2027	0.2421

实施例 5 蜜蜂工蜂血淋巴中 Royalisin 含量的 Elisa 测定

1. 蜜蜂的取样、免疫处理和血淋巴提取

(1) 采集蜜蜂和染菌处理

从养蜂场随机各挑一个中华蜜蜂和意大利蜜蜂蜂箱, 分别巢脾, 用广口瓶随机取 100 只左右工蜂。分为三组:

① 不处理组: 各取中蜂、意蜂工蜂 30 只。

[0057] ② 各取中蜂、意蜂工蜂 60 只, 用 CO_2 麻醉后, 每只工蜂在腹部注射 50cfu/g 的大肠杆菌 2 μl 染菌, 然后置养虫笼内, 用 10% 的蜂蜜水饲养, 隔离 24 小时回捕。

[0058] ③ 各取中蜂、意蜂工蜂 60 只, 用 CO_2 麻醉后, 每只工蜂在腹部注射 50 cfu/mL 的大肠杆菌 2 μl 染菌, 然后置养虫笼内, 用 10% 的蜂蜜水饲养, 隔离 48 小时回捕。

[0059] (2) 提取蜜蜂血淋巴

分别从上述三组蜜蜂中随机采集中蜂和意蜂 15 头, 以 5 头蜜蜂为 1 个样本, 各设 3 次重复。用剪刀切开蜜蜂颈部背面, 让血淋巴自动涌出, 用毛细管吸取, 将收集的血淋巴加入离心管, 同时加入微量苯基硫脲, 防止血浆中苯酚基氧化酶活化使血淋巴黑化, 离心除去血细胞。取上清备用。

[0060] 2. 用 GST-AccRoyalisin 多克隆抗体测定中蜂和意蜂血清中抗菌肽含量

分别吸取中蜂和意蜂血淋巴 10 μL , 加入 PBS 990 μL , 摇匀, 配成浓度为 10 $\mu\text{g/ml}$ 的溶液, 每孔加 100 μL /孔。按以上 Elisa 方法, 分别测定中蜂和意蜂血淋巴的吸光值 (OD_{450}) 值, 结果见表 2。将各吸光值代入实施例 4 中的标准曲线 $y = 0.017x + 0.067$ 的 Y 项, 换算得到血淋巴中抗菌肽含量 (X)。

[0061] 表 2 用 GST-AccRoyalisin 抗体测定中蜂和意蜂血淋巴中抗菌肽含量结果

	接菌后时间(h)		I	II	III	平均值
	0	吸光值	0.1883	0.1861	0.1865	
		含量($\mu\text{g}/\mu\text{L}$)	7.1353	7.0059	7.0294	7.06 ± 0.07
中蜂	24	吸光值	0.2043	0.2122	0.2107	
		含量($\mu\text{g}/\mu\text{L}$)	8.0765	8.5412	8.4529	8.36 ± 0.25
	48	吸光值	0.2437	0.2462	0.2461	

		含量($\mu\text{g}/\mu\text{L}$)	10.3941	10.541	10.5353	10.49 ± 0.08
	0	吸光值	0.1606	0.1619	0.1659	
		含量($\mu\text{g}/\mu\text{L}$)	5.5059	5.5824	5.8176	5.64 ± 0.16
意蜂	24	吸光值	0.1717	0.1702	0.1799	
		含量($\mu\text{g}/\mu\text{L}$)	6.1588	6.0706	6.6412	6.29 ± 0.32
	48	吸光值	0.2091	0.2029	0.2017	
		含量($\mu\text{g}/\mu\text{L}$)	8.3588	7.9941	7.9235	8.09 ± 0.23

将表 2 结果作 t 检验,并作图分析(图 4),结果显示中蜂血淋巴中抗菌肽含量在接菌前、接菌 24 小时后和 48 小时后均极显著地高于意蜂($p<0.01$)。表明中蜂对致病菌的抗病免疫力高于意蜂。同时,接菌免疫 24 小时后和 48 小时后,中蜂和意蜂血淋巴中的抗菌肽含量均显著提高,表现出明显的免疫应答。且中蜂的免疫应答比意蜂强。这对之前国内学者(Xu, P., et al. *PLoS ONE*. 2009, 4:1-9.)关于中蜂西方抗菌肽能力高于意蜂的报道作了很好的验证。因此,GST-AccRoyalisin 抗体适合于评价蜂种和蜂群的抗病力。

[0062] 实施例 5 Elisa 间接法定量测定蜂王浆中 Royalisin 的含量

称取蜂王浆冻干粉 1.5 mg,用 1 ml PBS 溶解,摇匀,配成浓度为 1.5 mg/ml 的溶液,经高速离心,取上清为抗原,稀释 10 倍,加样于 96 孔板,每孔加 10 μL /孔,按以上 Elisa 方法,用 GST-AccRoyalisin 抗体作为一抗,测定吸光值(OD_{450})值,结果见表 3。将各吸光值代入实施例 4 中的标准曲线 $y = 0.017x + 0.067$ 的 Y 项,换算得到蜂王浆冻干粉中抗菌肽平均含量(X)为 $0.49\pm0.23 \mu\text{g}/\mu\text{L}$,即 $100\times0.49/15=3.3\%$ 。

[0063] 表 3 蜂王浆中 Royalisin 的含量测定结果(n=3)

	1	2	3	平均
OD 值	0.0789	0.0758	0.0713	
抗菌肽含量 ($\mu\text{g}/15\mu\text{g}$)	0.70	0.52	0.25	0.49 ± 0.23
抗菌肽含量 (%)	4.67	3.45	1.69	3.27 ± 1.50

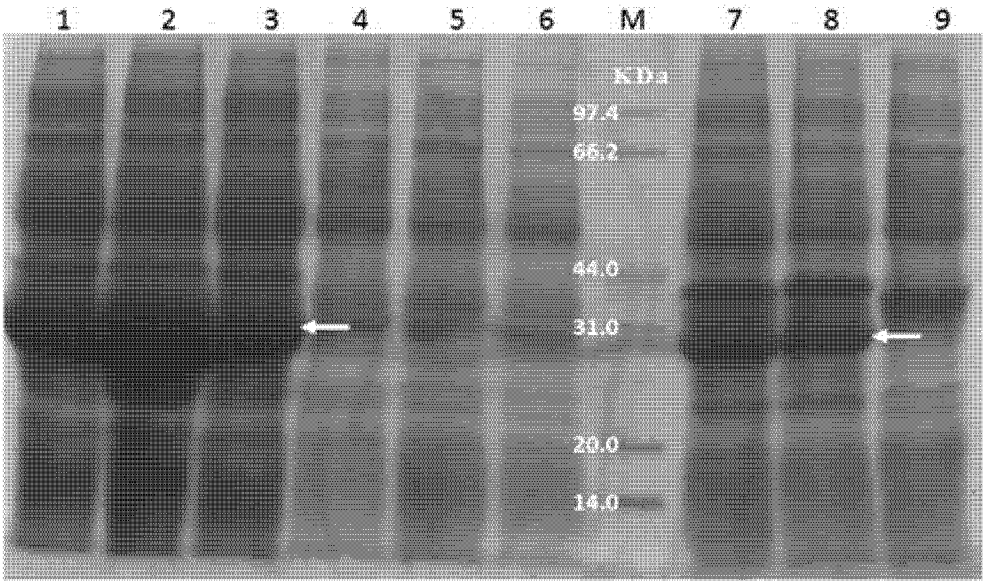


图 1

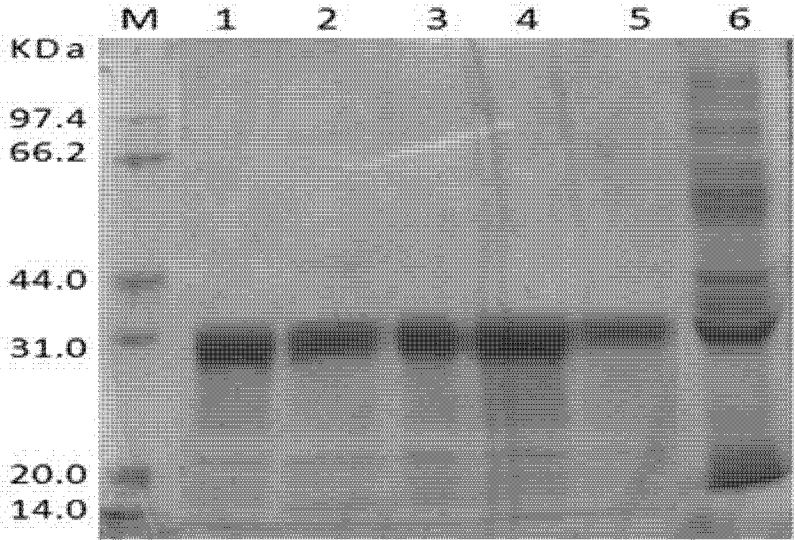


图 2

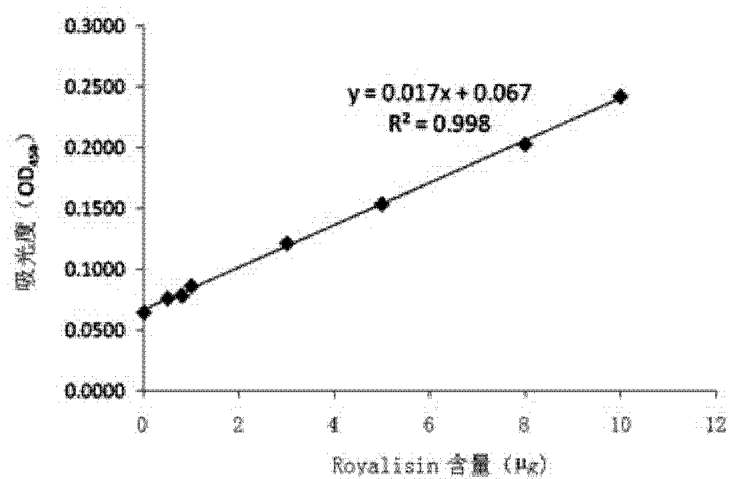


图 3

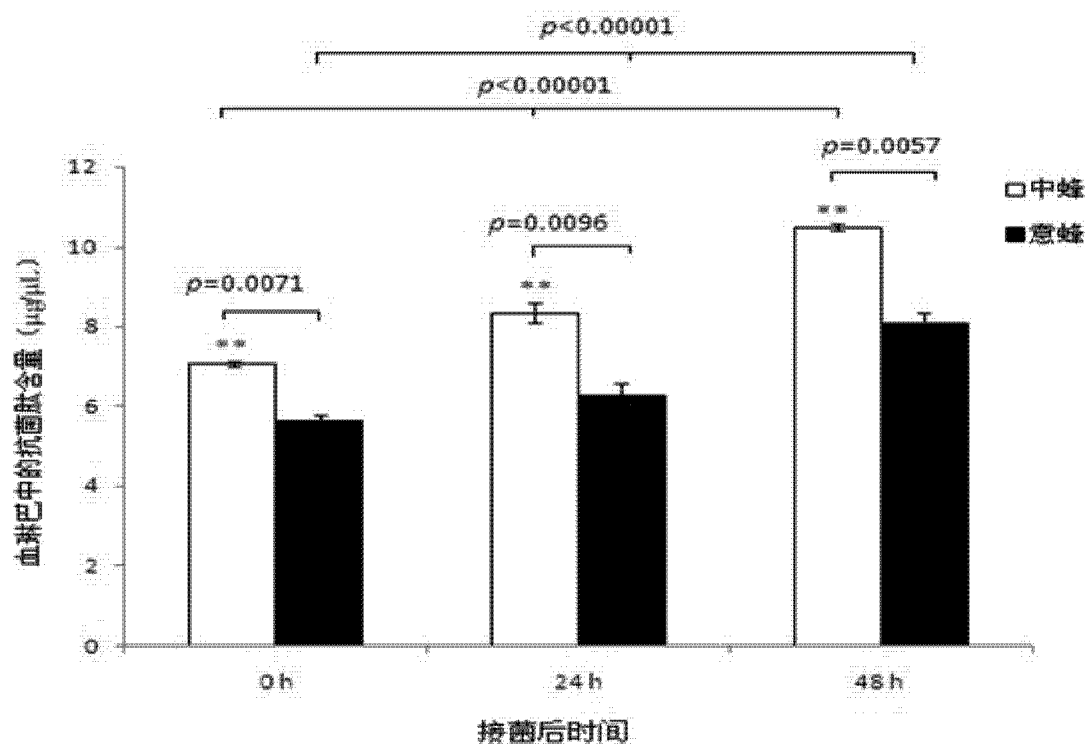


图 4

专利名称(译)	一种中华蜜蜂抗菌肽AccRoyalisin多克隆抗体的制备方法及其用途		
公开(公告)号	CN103044549A	公开(公告)日	2013-04-17
申请号	CN201210573720.8	申请日	2012-12-26
[标]申请(专利权)人(译)	浙江大学		
申请(专利权)人(译)	浙江大学		
当前申请(专利权)人(译)	浙江大学		
[标]发明人	沈立荣 李玖璐 王一然 谭量量 金凤 丁美会 陈正贤		
发明人	沈立荣 李玖璐 王一然 谭量量 金凤 丁美会 陈正贤		
IPC分类号	C07K16/18 C07K16/06 C07K19/00 C12N15/12 C12N15/70 G01N33/68 G01N33/53		
外部链接	Espacenet SIPO		

摘要(译)

本发明公开了一种中华蜜蜂抗菌肽AccRoyalisin多克隆抗体的制备方法及其用途。以大肠杆菌重组表达的中华蜜蜂王浆抗菌肽AccRoyalisin为抗原，免疫大白兔制备的多克隆抗体，该抗体效价大于40000倍；以此多克隆抗体为一抗，以重组表达的GST-AccRoyalisin为标准蛋白抗原作倍比稀释，用酶标仪通过Elisa法检测不同浓度GST-AccRoyalisin蛋白样品的吸光度，建立吸光度与MRJP1蛋白浓度的标准曲线。将不同蜂种或不同蜂群的血淋巴、蜂王浆冻干粉稀释后作为抗原，采用Elisa法检测得到样品的吸光度，代入所建立的标准曲线，计算得到样品的Royalisin的含量。本发明为Royalisin抗体提供了一种新的用途，为养蜂领域蜂中和蜂群抗病力的评价、抗病蜂群的选育，为蜂王浆防腐抗菌性能的评价提供了一种快捷的定性定量检测新方法。

