

大豆皮中大豆球蛋白、 β -伴大豆球蛋白和凝集素免疫活性的检测

王涛, 秦贵信, 赵元, 孙泽威, 王利民, 鲍男, 张兵, 朱丹, 孙玲, 王合峰

(吉林农业大学动物科技学院, 吉林长春 130118)

摘要:由于大豆皮具有多种有益的功能,因而被添加于多种动物的饲料中。国内外学者对大豆皮的研究主要集中在大豆皮的可消化性和能量价值,而对大豆皮中抗营养因子组成及含量的研究报告非常的少。本文用竞争 ELISA 法对大豆皮中具有免疫活性大豆球蛋白、 β -伴大豆球蛋白和凝集素的含量进行了测定,结果显示生大豆皮中具有免疫活性的大豆球蛋白、 β -伴大豆球蛋白和凝集素的含量分别为 25.3、41.4 和 12.2 mg g^{-1} ,说明大豆皮中含有相当高水平的抗营养因子。因此,大豆皮添加到动物饲料中之前,必须经过适当的加工处理,以在最大程度上灭活其中具有免疫活性的抗营养因子,且应该注意添加量等问题。

关键词:大豆皮;大豆球蛋白; β -伴大豆球蛋白;凝集素;竞争 ELISA 法

Determination of Immunocompetence of Glycinin β -conglycinin and Soybean Agglutinin in Soybean Hulls

WANG Tao, QIN Gui-xin, ZHAO Yuan, SUN Ze-wei, WANG Li-min, BAO Nan, ZHANG Bing, ZHU Dan, SUN Ling, and WANG He-feng

(College of Animal Science and Technology, Jilin Agricultural University, Changchun 130118, Jilin, China)

Abstract: Soybean hull is added to the diet for its multifunctional characteristics. Researches of soybean hulls mostly focused on its digestibility and energy value, little reports were found on their content of antinutritional factors. The immunocompetence of glycinin, β -conglycinin and soybean agglutinin in soybean hulls were determined by the inhibition ELISA in this article; Results showed that the immunocompetence of glycinin, β -conglycinin and soybean agglutinin in soybean hulls was 25.3, 41.4, and 12.2 mg g^{-1} , respectively, which showed that the immunocompetence of glycinin, β -conglycinin and soybean agglutinin in soybean hulls was quite high. So it is necessary to process the soybean hulls in order to make the immunocompetence of glycinin, β -conglycinin and soybean agglutinin in soybean hulls inactive before adding it to the diet, and more attention should be paid on the additive quantity.

Key words: Soybean hulls; Glycinin; β -conglycinin; Soybean agglutinin; Inhibition ELISA

大豆皮是指在生产大豆高蛋白制品加工过程中经过去皮加工工艺而得到的一种重要的副产品。大豆皮占大豆籽实重量的平均比例达 8%, Kornegay (1981) 检测到大豆皮中蛋白质含量为 11.00% ~ 13.26%, 而且大豆皮中某些氨基酸占蛋白质的比例较高, Cunningham 等 (1993) 证明大豆皮中赖氨酸含量约为干物质重的 0.71% ~ 0.72%, Rackis 等 (1961) 发现大豆皮中甘氨酸的含量比豆粕高出 48%; Muzilla 等 (1989) 还发现大豆皮中所富含的纤维物质具有多种有益的生理功能。因此大豆皮在饲料工业中的应用前景十分广阔。但是国内外学者对

大豆皮的研究主要集中在大豆皮的可消化性和能量价值,对大豆皮中抗营养因子组成及含量的研究非常少。本文用竞争 ELISA 法测定了生大豆皮中具有免疫活性大豆球蛋白、 β -伴大豆球蛋白和大豆凝集素的含量。

1 材料与方法

1.1 材料

大豆凝集素标准品 (Sigma, L1395); 包被抗原 (实验室自制); 牛血清白蛋白 (购自北京鼎国生物有限公司); 抗体 (实验室自制); 羊抗兔 IgG 酶标抗

收稿日期 (Received): 2007-08-02; 接受日期 (Accepted): 2007-12-11

基金项目: 国家自然科学基金重点项目 (30430520)

作者简介: 王涛 (1984-), 男, 硕士研究生, 研究方向饲料抗营养因子。E-mail: faithhill2002@163.com。

通讯作者 (Corresponding author): 秦贵信, 教授, 博士生导师。

体 1:1 000(北京鼎国生物有限公司);N-乙酰基-D-半乳糖胺-epoxy-Sepharose 6B 胶(购于 Sigma);丰交 7607 生大豆(购于吉林长春春雨种子有限公司);高速粉碎器(购于北京鼎国生物有限公司);恒温水浴震荡器(巨轮牌,河北省黄骅市航天仪器厂);96 孔聚苯乙烯微量反应板(购自北京鼎国生物有限公司);37℃光照培养箱(LRH-GII 广东省医疗器械厂);酶标仪(DG-3022 型南京华东电子管厂生产);低温高速离心机(Sigma);85-2 磁力搅拌机(江苏金坛市金城国胜实验仪器厂);层析柱(购于北京鼎国生物有限公司);UV2102 紫外可见光分光光度计(Unico 上海仪器有限公司);BS-160 型自动收集器(上海沪西分析仪器厂);PHS-3C 型酸度计(上海伟业仪器厂)。

1.2 方法

1.2.1 样品的制备 取生大豆 100 g,机械压碎,取皮称重,将生豆皮用高速粉碎器粉碎,过 100 目筛,收集过筛物质,以 1:10 的比例用 0.025 mol L⁻¹ Tris-HCl(PH 8.6)稀释,室温下水浴震荡 30 min,4℃,10 000 r min⁻¹ 条件下离心 15 min,取上清液,冷冻备用。

1.2.2 竞争 ELISA 法检测大豆球蛋白及 β -伴大豆球蛋白的免疫活性 大豆球蛋白和 β -伴大豆球蛋白的免疫活性检测的方法参照(Iwabuchi and Yamauchi,1987;Perez et al.,2000)的方法进行,具体步骤如下:

包被已知抗原:将 0.3 mL 的大豆球蛋白或 β -伴大豆球蛋白(每种蛋白用 50 mmol L⁻¹ 的 NaHCO₃ 缓冲液溶解,浓度为 1 μ g mL⁻¹)分别滴到包被板中,37℃下孵育 3 h。用 PBST 冲洗 3 次,甩干。

封闭:用 1% BSA 溶液封闭加样孔,每孔 0.1 mL,37℃下孵育 1 h。用 PBST 冲洗 3 次,甩干。

加入待检抗原:用磷酸盐缓冲液(PBST)分别适当稀释待测样,相应的加入到球蛋白包被的孔中(0.1 mL/孔)。

加入抗体:用 PBST 稀释抗大豆球蛋白抗体或抗 β -伴大豆球蛋白抗体(1 μ g mL⁻¹),每孔 0.1 mL/孔。然后在 37℃温箱内培养 2h 后,用 PBST 冲洗 3 次,甩干。

加入酶标二抗:往每孔加入 0.1 mL 的用辣根过氧化物酶标记的抗兔 IgG 抗体(1:1 000)。在 37℃温箱内培养 2 h,包被板用 PBST 冲洗 3 次,甩干。

加入底物:每孔加入 0.1 mL 的底物。培养 10

min 后,每孔再加入 50 μ L 的终止液以终止反应,测 490 nm 处光密度值(OD 值)。

1.2.3 竞争 ELISA 法检测凝集素的免疫活性

大豆凝集素的分离提纯参照荆剑等(2003)进行,并参照何昭阳等(2005)的方法制备和纯化得到大豆凝集素的抗体,竞争 ELISA 检测凝集素的免疫活性的具体步骤依李振田(2003)的方法进行,具体如下:将 5 μ g mL⁻¹ 纯化后的大豆凝集素,每孔 300 μ L 包被于聚苯乙烯微量反应板中,37℃孵育 3 h,然后用 PBST 洗涤 3 次;加入 1% BSA 溶液封闭,37℃孵育 2h 后,用 PBST 洗涤 3 次;将标准曲线抗原作梯度稀释(1 mg mL⁻¹,100 μ g mL⁻¹,10 μ g mL⁻¹,1 μ g mL⁻¹,100 ng mL⁻¹,10 ng mL⁻¹),待测样品作适当稀释后,加入相应空中,每孔 100 μ L,然后再各孔中加入 10 μ g mL⁻¹ 的纯化兔抗 SBA 抗体 100 μ L,37℃孵育 2 h 后,用 PBST 洗涤 3 次;加入 1:5 000 稀释的羊抗兔 IgG-HRP,每孔 100 μ L,37℃孵育 1 h 后,用 PBST 洗涤 3 次;每孔加入底物溶液 100 μ L,避光显色 15 min,每孔加入 50 μ L 的终止液以终止反应,在酶标仪上检测 OD₄₉₂ 值。

2 结果与分析

2.1 竞争 ELISA 法检测生大豆皮中大豆球蛋白、 β -伴大豆球蛋白和凝集素的标准曲线

在竞争 ELISA 检测法中,由绘制的标准曲线(如图 1)可知,大豆球蛋白、 β -伴大豆球蛋白和大豆凝集素的含量与光密度值(OD 值)成反比。

经过图 1 竞争 ELISA 检测法所绘制的标准曲线计算得知:生大豆皮中具有免疫活性的大豆球蛋白、 β -伴大豆球蛋白和大豆凝集素的含量分别为 25.3、41.4 和 12.2 mg g⁻¹,大豆皮中抗营养因子的含量与大豆的品种及种植地区的气候等多种因素有关。选用的大豆为吉林省广泛种植的丰交 7607 大豆品种,而其它品种豆皮中抗营养因子含量尚不清楚。

2.2 大豆皮中具有免疫活性的大豆球蛋白、 β -伴大豆球蛋白和大豆凝集素的含量

生大豆皮中具有免疫活性的大豆球蛋白、 β -伴大豆球蛋白和大豆凝集素的含量如表 1 所示,从表 1 中的结果,可以看出,在生大豆皮中具有免疫活性的大豆球蛋白、 β -伴大豆球蛋白和大豆凝集素的含量分别为 25.3 mg g⁻¹,41.4 mg g⁻¹,12.2 mg g⁻¹,占生大豆皮中总蛋白质的比例分别约为 19.5%,

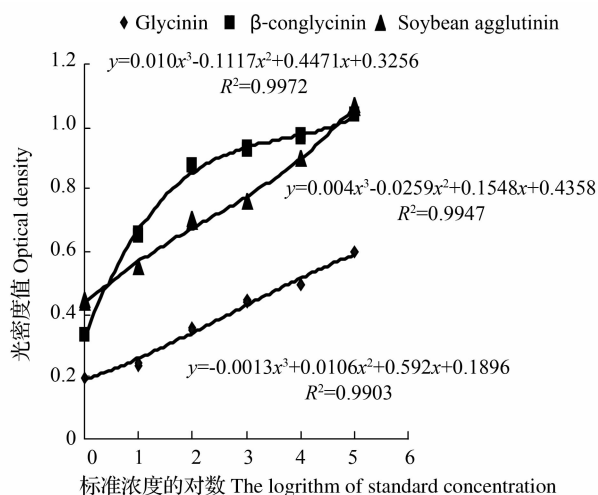


图1 大豆球蛋白、 β -伴大豆球蛋白和大豆凝集素免疫活性检测的标准曲线图

Fig.1 Inhibition ELISA calibrations curves for glycinin, β -conglycinin and soybean agglutinin

31.8%, 9.3%, 也就是说在生大豆皮中具有免疫活性的这三种蛋白质占生大豆皮中总蛋白质的比例为60.6%。李德法等(2003)提到大豆总蛋白中具有免疫活性的大豆球蛋白和 β -伴大豆球蛋白分别为10%~20%和1%~2% Sharon 和 Lis(2002)提出大豆总蛋白中具有活性的凝集素含量为1%, 可知这三者占大豆中总蛋白质的比例不超过23%。由此可见生大豆皮中具有免疫活性的抗营养因子占总蛋白的比例远高于整粒大豆中的比例。这在一定程度上解释了马秋枝和刘强(2006)所论述的大豆皮具有防止微生物、昆虫、鸟类及其他天敌的破坏作用的观点。

表1 生大豆皮中大豆球蛋白和 β -伴大豆球蛋白和凝集素的免疫活性

Table1 Immunocompetence of glycinin, β -conglycinin and lectin in soybean hulls mg g^{-1}

大豆球蛋白 Glycinin	β -伴大豆球蛋白 β -glycinin	凝集素 Lectin
25.3	41.4	12.2

3 讨论

Barratt 等(1979)和 Sissons (1982)研究表明,大豆球蛋白和 β -伴大豆球蛋白对犊牛的消化道具有很强的致敏作用,可引起犊牛产生过敏反应,血清中大豆抗原特异性的滴度升高,犊牛肠道结构损伤,

消化吸收障碍,继发过敏性腹泻。杨昱萍等(2006)提到对断奶仔猪来说,大豆蛋白中引起过敏反应的主要抗原成分为大豆球蛋白和 β -伴大豆球蛋白。当断奶仔猪采食含大豆蛋白的日粮后,大部分大豆球蛋白和 β -伴大豆球蛋白,被降解为肽和氨基酸,只有大约0.002%穿过小肠上皮细胞间或细胞内的空隙完整地进入血液和淋巴,刺激肠道免疫组织,产生过敏反应(包括特异性抗原抗体反应和T淋巴细胞介导的迟发型过敏反应),在肠道功能异常中所起的作用是不一样的,前者刺激肥大细胞释放组织胺,引起上皮细胞通透性增加和黏膜水肿,而后者主要引起肠道形态变化。潘洪彬等(2005)提出大豆凝集素每个亚基有一个与糖分子特异性结合的专一位点,在该位点能识别并结合小肠壁表面绒毛上的特定糖基,使绒毛产生病变和异常发育,进而干扰消化吸收过程。可见大豆中的这几种主要的抗营养因子对动物的健康造成了很大的威胁。因此应该注意大豆皮添加前的处理及在动物日粮中添加量等问题,而且不同种类和生理阶段的动物所需的添加量有很大差别。Cole(1999)建议在动物日粮中的大豆皮的添加量如下:犊牛10%,奶牛25%,肉牛25%,羔羊10%,母羊20%,肥育猪5%,母猪10%,狗7.5%~9.0%。此结果与大豆皮的组成成分密切相关,大豆皮的低蛋白特点使之不适于对蛋白要求很高的单胃动物;大豆皮在幼龄动物的日粮中的添加量不应太高,这可能归因于大豆皮中大量抗营养因子的存在;对于成熟的反刍动物来说,由于其发达的瘤胃,当在其日粮中添加较高比例的大豆皮时也没有副作用。本试验的结果与这些建议在一定程度上是一致的。

4 结论

大豆皮中含有相当高水平的抗营养因子。因此,大豆皮添加到动物饲料中之前,必须经过适当的加工处理,以在最大程度上灭活其中具有免疫活性的抗营养因子,且应该注意添加量等问题。

References

- Barratt M E J, Strachan P J, and Porter P. 1979. Immunologically mediated nutritional disturbances associated with soyaprotein antigens. *Proceedings of the Nutrition Society*, 38:143-150
- Cole J T, Fahey G C, Merchen N R, Patil A R, Murray S M, Hussein H S, and Brent J L. 1999. Soybean hulls as a dietary fiber source for dogs. *Journal of Animal Science*, 77:917-924

- Cunningham K D, Cecava M J, and Johnson. T R. 1993. Nutrient digestion, nitrogen, and amino acid flows in lactating cows feed soybean hulls in place of forage or concentrate. *Journal of Dairy Science*, 76: 3523-3535
- He Z Y, Hu G X, and Wang C F, eds. 2005. *Animal immunological technology*. Jilin Science Technology Press, China, Changchun, pp. 71-76 (何昭阳, 胡桂学, 王春风, 著. 2005. *动物免疫学实验技术*. 吉林科学技术出版社, 中国, 长春, pp. 71-76)
- Iwabuchi S, and Yamauchi F. 1987. Determination of glycinin and β -conglycinin in soybean protein by immunological methods. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 35: 200-205
- Jin J, Zhao X, and Zhang Y. 2003. Purification of Soybean Agglutinin and the Investigation of its Agglutination of different Tumor Cells. *Journal of China Biological Chemistry and Molecular Biology*, 19(3): 401-405. (荆剑, 赵翔, 张页. 2003. 大豆凝集素的纯化及其凝集不同肿瘤细胞的探讨. *中国生物化学与分子生物学报*, 19(3): 401-405)
- Kornegay E T. 1981. Soybean hull digestibility by sows and feeding value for growing finishing swine. *Journal of Animal Science*, 53: 138-145
- Li D F, ed. 2003. *Soybean Antinutritional Factors*. China Science Press, China, Beijing, pp. 154 (李德法, 著. 2003. *大豆抗营养因子*. 中国科学技术出版社, 中国, 北京, pp. 154)
- Li Z T. 2003. Determination, Purification of Soybean Agglutinin and the Investigation of its Antinutritional Mechanism on Rat. Dissertation for Ph D, College of Animal Science and Technology of China Agricultural University, Supervisor: Li D F, pp. 20-28 (李振田. 2003. 大豆凝集素的检测/纯化和对大鼠抗营养机理的研究. 博士学位论文. 中国农业大学动物科学技术学院, 导师: 李德法, pp. 20-28)
- Ma Q Z, and Liu Q. Advance of Lectin Research. *Guangdong Feed*, 15(5): 23-25 (马秋枝, 刘强. 2006. 植物凝集素的研究进展. *广东饲料*, 15(5): 23-25)
- Muzilla Unklesbay M N, Helsel Z, Unklesbay K, and Eilersieck M. 1989. Effect of particle size and heat on absorptive properties of soyhulls. *Journal of Food Quality*, 12: 305-318
- Pan H B, Qin G X, and Sun Z W. 2005. Research Advances of Antinutrition on Soybean Lectin Antinutrition. *Soybean Science*, 24(3): 210-215 (潘洪彬, 秦贵信, 孙泽威. 2005. 大豆凝集素抗营养的研究进展. *大豆科学*, 24(3): 210-215)
- Perez M D, Mills E N C, Lambert N, Johnson I T, and Morgan M R A. 2000. The use of anti-soya globulin antisera in investigating soya digestion in vivo. *Science of Food and Agriculture*, 80: 513-521
- Rackis J J, Anderson R L, Sasame H A, Smith A K, and VanEtten C H. 1961. Amino acids in soybean hulls and oil meal fractions. *Journal of Agricultural Food Chemistry*, 9: 409-412
- Sharon N, and Lis H. 2002. How proteins bind carbohydrate: lessons from legume lectins. *Journal of Agricultural Food Chemistry*, 50: 6586-6591
- Sissons J W. 1982. Effects of soybean products on digestive processes in the gastrointestinal tract of preruminant calves. *Proceedings of the Nutrition Society*, 41: 53-61
- Yang Y P, Tong J M, Sa R N, and Zhang S Y. 2006. Research advances of allergic factor one of the soybean antinutritional factors. *China Animal Husbandry and Veterinary Medicine*, 33(11): 7-10 (杨昱萍, 佟建明, 萨仁娜, 章世元. 2006. 大豆抗营养因子—致敏因子的研究进展. *中国畜牧兽医*, 33(11): 7-10)