

日粮中大豆抗原蛋白检测方法的研究进展

张诗尧¹, 赵元¹, 刘丹丹¹, 鲍男¹, 赵寒冬², 张迪¹

(1. 吉林农业大学 动物科学科技学院/动物生产及产品质量安全教育部重点实验室/吉林省动物营养与饲料科学重点实验室, 吉林 长春 130118; 2. 长春农业博览园, 吉林 长春 130118)

摘要:大豆抗原蛋白对动物造成不利的影响和不易灭活的特性,限制了大豆及其制品在动物饲料行业的应用。而在当前蛋白质资源短缺的形式下,如何快速、简便、准确地检测出大豆中的抗原蛋白成为亟需解决的重要问题。文中综述了几种有关大豆抗原蛋白的常用检测方法,并比较其检测效果,为生产中选择适当的测定方法提供理论依据。
关键词:大豆抗原蛋白;竞争 ELISA;双抗夹心 ELISA;检测方法
中图分类号: **文献标识码:**A **DOI:**10. 11861/j. issn. 1000-9841. 2015. 03. 0518

Reviews on the Detection Methods of Soybean Allergic Proteins in Diets

ZHANG Shi-yao¹, ZHAO Yuan¹, LIU Dan-dan¹, BAO Nan¹, ZHAO Han-dong², ZHANG Di¹

(1. College of Animal Science and Technology, Jilin Agricultural University/Key Laboratory of Animal Production, Product Quality and Security, Ministry of Education, Changchun 130118, China; 2. Changchun Agriculture Expo Park, Changchun 130118, China)

Abstract: Soybean allergic protein may lead to several negative effects to animals, combined with the difficulty of its inactivated features, which become a bottleneck of animal nutrition industry. Thus, under the circumstance of shortage of the protein resource, the fast, simple and accurate detection methods of soybean allergic protein become an important problem which needs to be solved. In this paper, we reviewed and compared several detection methods of soybean allergic protein and provided a basis for selecting an appropriate detection method.
Keywords: Soybean antigen protein; competitive ELISA; Double-antibody sandwich ELISA; Detection

致敏蛋白就是大多数豆类籽实中含有的一种大分子蛋白或糖蛋白,被动物摄入后能改变体液免疫功能,引起肠道过敏反应。大豆抗原蛋白是大豆中主要的致敏蛋白,其中大豆球蛋白和 β -伴大豆球蛋白又是大豆抗原蛋白引起机体过敏和腹泻的主要成分。目前研究证实大豆球蛋白的含量在2%以上即可引起仔猪的过敏反应^[1],并且表现出大豆抗原特异性抗体滴度升高、小肠绒毛萎缩、隐窝细胞增生,进而导致消化吸收障碍、生长受阻以及过敏性腹泻等一些不良的症状^[2-5]。

由此可以看出,大豆抗原蛋白的存在阻碍了动物营养行业的可持续发展,建立快速、有效、准确的大豆抗原蛋白的检测方法是该行业发展的必要环节。多年来很多学者在这方面做了大量研究,常见的检测方法有酶联免疫吸附试验(ELISA)、免疫印迹、免

疫组化、PCR等。本文综述了近几年国内外报道的应用这几种方法的检测效果,并进行了比对分析,以期为今后饲料与食品工业的质量检测提供理论依据。

1 大豆抗原蛋白的结构及其致敏机理

1.1 大豆抗原蛋白的结构

大豆球蛋白和 β -伴大豆球蛋白是大豆抗原蛋白主要的致敏蛋白,其中大豆球蛋白又称11S,是大豆中主要的贮藏蛋白,占大豆籽实总蛋白的19.5%~23.1%,其结构是分子量为34.8 ku的酸性亚基和分子量为19.6 ku碱亚基相互交替构成的相对比较稳定的两个环状的六角形结构,但由于大豆球蛋白含有较多的含硫氨基酸,一些化学试剂可使其二硫键断裂,改变四级结构,增加其溶解度; β -伴大豆球

收稿日期:2014-02-18
基金项目:国家自然科学基金青年基金(31101719);吉林省科技发展规划项目青年科研基金(201201098);国家“十二五”科技支撑计划(2013BAD17B0);吉林省教育厅“十二五”科学技术研究规划项目(2015198)。
第一作者简介:张诗尧(1991-)女,在读硕士,主要从事动物营养与饲料科学研究。E-mail:1151352731@qq.com。
通讯作者:赵元(1981-)女,博士,副教授,主要从事饲料抗营养因子的研究。E-mail:zhaoyuan4CL52@126.com。

蛋白又称 7S, 占大豆籽实总蛋白的 10% ~ 12.7%, 分子量为 150 ~ 200 ku, 其结构是由 α 、 α' 和 β 三条亚基构成的稳定的三聚体, 分子量分别为 68, 72, 52 ku。^[6-8]

1.2 大豆抗原蛋白的致敏的机理

当动物食入含有大豆的日粮并进入消化道后, 大部分蛋白被消化道中的消化酶分解成为一些小分子物质后被吸收, 使其失去抗原活性, 不会对动物造成致敏反应; 另外一部分具有抗原活性的大分子物质进入血液和淋巴后, 刺激消化道黏膜免疫系统, 会引起机体特异性 IgE 介导的速发型、抗原抗体复合物介导的免疫复合型、T 淋巴细胞介导的迟发型等过敏反应^[9]。李德发^[10]利用采食含大豆抗原蛋白日粮的仔猪和犊牛进行试验, 发现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, 少部分(0.002%) 穿过小肠上皮细胞间或上皮细胞内的空隙完整地进入血液和淋巴, 刺激肠道免疫组织, 产生特异性抗原抗体反应和 T 淋巴细胞介导的迟发性过敏反应。前者刺激肥大细胞释放组胺, 引起上皮细胞通透性增加和黏膜水肿, 后者则引起肠道形态变化, 进而引起机体一系列的过敏腹泻等反应^[11]。

2 大豆抗原蛋白的测定

在日常的试验中主要通过高效液相和免疫学技术检测大豆抗原蛋白。经过长期试验对以上两种检测方法进行对比, 高效液相色谱法在使用上比较消耗时间并且仪器相对昂贵, 不适合实际生产中的应用, 所以在日常的临床试验中免疫学检测技术受到了广泛的推广, 其中包括酶联免疫吸附试验(ELISA)、免疫印迹、免疫组化、PCR 等。

2.1 酶联免疫吸附试验

酶联免疫吸附试验是基于蛋白质水平的免疫技术之一, 抗原或抗体结合在固相载体表面使其保持免疫学活性, 酶标记的抗原或抗体(由于酶的催化效率高, 间接地放大免疫反应的结果, 使测定方法达到很高的敏感度)既保留免疫学活性, 又保留酶的活性, 之后加入酶反应的底物, 底物被酶催化成为有色产物, 产物的量与标本中受检物质的量直接相关, 故可根据呈色的深浅进行定性或定量分析。常见的检测方法有双抗夹心 ELISA 的检测方法和竞争 ELISA 的检测方法。

2.1.1 双抗夹心 ELISA 的检测方法 双抗体夹心多用于检测抗原。待检对象必须包括两个或两个以上的表位, 否则检测抗体无法与待测抗原结合, 例如半抗原和小分子抗原都不能用于双抗夹心 Elisa 检测。韩景华^[12]建立了大豆 11S 球蛋白双抗体夹心 ELISA 检测方法, 其检测灵敏度达到 $2.5 \text{ ng} \cdot \text{mL}^{-1}$, 检测范围为 $2.5 \sim 5\,000 \text{ ng} \cdot \text{mL}^{-1}$, 同时陈家杰^[13]也使用相同的方法检测食品中大豆过敏原蛋白成分, 最低检出限为 $\sim 100 \text{ ng} \cdot \text{mL}^{-1}$, 标准曲线在 $100 \sim 12.8 \mu\text{g} \cdot \text{mL}^{-1}$ 范围内线性良好; 由此可以看出 ELISA 检测方法是利用微量的抗原抗体反应, 灵敏度非常高, 适合在临床试验中的检测。但在 1998 年 Bando 等^[14]以一种单克隆抗体作为一抗, 利用偶联了过氧化物酶的单克隆抗体作为二抗, 建立了 Gly m Bd 28K 的夹心 ELISA 检测方法, 对多种大豆制品的 Gly m Bd 28K 的含量进行了测定, 结果显示大豆分离蛋白、豆腐中 Gly m Bd 28K 含量相对较高, 但在一些发酵产品和加工过的大豆分离蛋白中均未检出 Gly m Bd 28K。

2.1.2 竞争 ELISA 的检测方法 当抗原材料中的干扰物质不易除去或不易得到足够的纯化抗原时, 可用竞争 ELISA 的检测方法。其原理是用待测抗体或抗原去干扰已经预先设计好的体系, 最终显色的结果与待检抗原或抗体的干扰程度呈负相关。Meiselz^[15]通过对大豆球蛋白酸性肽链测定, 其结果表明检测下限几乎达到纳克水平。You 等^[16]利用单克隆抗体, 通过竞争 ELISA 法测定抗原蛋白活性, 结果显示 IC50 值为 $4.7 \text{ ng} \cdot \text{mL}^{-1}$, 检测下限 $2.0 \text{ ng} \cdot \text{mL}^{-1}$ 。Xi 等^[17]利用同样的方法检测大豆抗原蛋白的检测限达到了 $0.3 \text{ ng} \cdot \text{mL}^{-1}$, 同时线性曲线在 $0.3 \sim 11.2 \text{ ng} \cdot \text{mL}^{-1}$ 。二者均得到了理想的试验效果。然而当 Pereze^[18]利用兔抗多克隆抗通过 ELISA 法识别大豆抗原蛋白的特异性, 检测日粮及消化道食糜中大豆抗原蛋白活性和食品及饲料中导致人或畜禽过敏蛋白时发现多克隆抗体在检测经消化道在食糜中的抗体比较好但是会减低准确性。所以通过对比竞争 ELISA 方法发现单克隆在检测一些完整的大豆会有一些优势。

根据以上试验效果的比对分析, 双抗夹心 ELISA 检测灵敏度高于竞争 ELISA。其中双抗夹心 ELISA 法比较适用于天然大豆蛋白的检测, 而竞争 ELISA 更适于检测加工后的大豆制品^[18]。

2.2 PCR 技术

PCR 技术的全称为聚合酶链式反应 (Polymerase Chain Reaction), 在 20 世纪 90 年代就被用于抗原蛋白的识别和检测, 是一种分子生物学技术, 用于放大特定的 DNA 片段。该技术可用于食品中微量大豆^[19]、榛子^[20-21]、花生^[22]等抗原成分检测。Meyer 等^[19]通过试验证实了 PCR 技术对于检测结构分布均匀且微量的大豆抗原蛋白有很高的灵敏度(蛋白的含量占其 0.007%), 但在后期使用 DNA 含量、质量和提取量等技术过程中都会使 PCR 技术受到影响, 因此就阻碍了此项技术发展和推广。

与 PCR 法相比, ELISA 法具有快速、准确、仪器化程度低、样品前处理相对简单、低成本等优点^[23], 适用于现场监控和大量样本筛查。

2.3 蛋白质免疫印迹法

蛋白质免疫印迹法是将蛋白质转移到膜上, 用相应抗体作为一抗进行检测。由于免疫印迹具有 SDS-PAGE 的高分辨力和固相免疫测定的高特异性和敏感性, 因此可用于抗原蛋白的定性和半定量检测。Babiker 等^[24]通过免疫印迹检测方法从大豆蛋白中准确检测出了 P34 蛋白。随后在 2010 年 Gagnon 等^[25]也以北美致敏患者血清为抗体, 利用双向电泳和质谱技术, 从大豆中检测出了 19 种抗原蛋白, 其中包括 5 种新致敏蛋白。由此可看出蛋白质免疫印迹的检测手段也具备一定的准确性, 但是在试验的过程中需要消耗的时间比较长, 并且试验成本比较大, 因此在一些常规的生产检测中受到了限制。

2.4 免疫组化法

免疫组化法是根据抗原与抗体特异性结合的原理, 通过化学反应使标记抗体的显色剂显色来确定组织细胞内抗原, 对其进行定位、定性及定量的研究。目前研究试验通过免疫组织化学方法, 分别对不同生理阶段的猪肠道中的大豆抗原蛋白进行定位, 在一定程度上揭示了大豆抗原蛋白在不同肠段组织中的分布规律^[26-27]。但是该方法在试验过程和后期分析都需要耗费大量的时间, 不利于临床检测的使用。

3 总 结

目前对大豆抗原蛋白的检测方法的研究已取得较大的研究进展, 酶联免疫吸附试验、免疫印

迹、PCR、免疫组化等技术都会相对准确的检测出大豆中主要的抗原蛋白, 但仍有些方面还有一些不足有待于进一步研究, 例如酶联免疫吸附试验中双抗夹心 ELISA 和竞争法, 在实验过程中多种抗体的使用和蛋白标品使用量都在无形中增加实验的成本, 而免疫印迹、PCR、免疫组化等技术在实验过程中步骤繁琐, 实验周期长, 需要的仪器比较昂贵, 难以在实际的生产中得到推广。

综上所述, 探讨如何快速、简单、准确、低成本地检测大豆中抗原蛋白的含量, 从而达到有效监控大豆制品的质量以及保障大豆制品在动物饲料中的安全、高效利用具有非常重要的理论研究价值和实际应用意义。

参考文献

[1] Li D F, Nelssen J L, Reddy P G, et al. Transient hypersensitivity to soybean meal in the early-weaned pig [J]. Journal of Animal Science, 1990(68): 1790.

[2] Li D F, Nelssen J L, Reddy P G, et al. Measuring suitability of soybean products for early weaned pigs with immunological criteria [J]. Journal of Animal Science, 1991(69): 3299.

[3] 孙志阔. 大豆抗原蛋白对仔猪的致敏性和免疫原性的研究 [D]. 合肥: 安徽农业大学, 2012. (Sun Z K. Study on allergenicity immurogenicity of saybean antigen protein in piglets [D]. Hefei: Anhui Agricultural University, 2012.)

[4] Dreau D, Lalles J P, Chevaleyre C, et al. Effects of antigenic soybean on gut tissue in early weaned pirllets [C]// Huisman J, van der Poel T F B, Liener I E. Recent advances of research in anti-nutritional factors in legume seeds. Pudoc; Wageningen, 1993: 271-279.

[5] Sun P, Li D F, Li Z J, et al. Effects of glycinin IgE-mediated increase of mast cell numbers and hista mine release in the small intestine [J]. Journal of Nutritional Biochemistry, 2008 (19): 627-633.

[6] Zhao Y, Qin G, Sun Z, et al. Disappearance of immunoreactive glycinin and β -conglycinin in the digestive tract of piglets [J]. Archives of Animal Nutrition, 2008, 4 (62): 322-330.

[7] Wang T, Qin G X, Zhao Y, et al. Comparative study on the stability of soybean (*Glycine max*) β -conglycinin in *in vivo* [J]. Food and Agricultural Immunology, 2009, 4 (20): 295-304.

[8] Wang T, Qin G, Sun Z, et al. Comparative study on the residual rate of immuno reactive soybean glycinin(11S) in digestive tracts of pigs indifferent ages [D]. Food and Agricultural Immunology. Vol. 00, No. 0, Month 2010, 1-8. DOI: 10.1080/09540100903563597.

[9] 陈代文. 日粮抗原与早期断奶仔猪腹泻的关系 [J]. 国外畜牧科技, 1994, 21(1): 37-40. (Chen D W. The diet antigen rela-

tionship with tarly weaning diarrhea piglets[J]. Foreign Animal Husbandry Science and Technology, 1994, 21(1):37-40.)

[10] 李德发. 大豆抗营养因子[M]. 北京:中国科学技术出版社, 2003. (Li D F. Soybean antinutritional factors[M]. Beijing:China Science and Technology Press,2003.)

[11] 刘明美,赵国琪. 大豆抗原蛋白对幼龄动物致敏作用的研究进展[J]. 中国饲料,2011(14):6-8. (Liu M M, Zhao G Q. Soybean protein antigen sensitization of young animals[J]. China Feed,2011(14):6-8.)

[12] 韩景华. 双抗体夹心 ELISA 检测大豆 11S 球蛋白方法的建立 [D]. 合肥:安徽农业大学,2009.

[13] 陈家杰. 双抗体夹心 ELISA 法测定食物中大豆过敏原蛋白成分[J]. 食品研究与开发,2009,30(5):105-109. (Chen J J. Detection of soybean allergen protein trace food products by sandwich-antibody enzyme linked immunosorbent assay[J]. Food Research and Development,2009,30(5):105-109.)

[14] Bando N, Tsuji H, Hiemori M, et al. Quantitative analysis of Gly m Bd 28K in soybean products by a sandwich enzyme-linked immunosorbent assay[J]. Journal of Nutritional Science and Vitamology, 1998, 44 (5):655-664.

[15] Meisel Z H. Enzyme-linked immunosorbent assay and immunoblotting using IgY antibodies against soybean glycinin A [J]. Int DairyJ,1993(3):149-1611.

[16] You J, Li D,Qiao S, et al. Development of amonoclonalantibody-based competitive ELISA for detection of β -conglycinin, an allergen from soybean[J]. Food Chemistry, 2008, 106 (1): 352-360.

[17] Xi M L, Peng S L, He P L. Development of monoclonal antibodies and a competitive ELISA detection method for glycinin, and allergen in soybean[J]. Food Chemistry, 2010,121:546-551.

[18] Perez M D, Mills E N, Lambert N, et al. The use of anti-soyaglobulin antisera in investigating soya digestion in vivo[J]. Journal of the Science of Food and Agriculture, 2000, 80 (4): 513-521.

[19] Meyer R, Chardonnens F, Hubner P, et al. Polymerase chain reaction (PCR) in the quality and safety assurance of food: detection of Soya in processed meat products[J]. Lebensm Unters Forsch, 1996(203):339-344.

[20] Holzhauser T, Wangorsch A, Vieths S. Polymerase chain reaction (PCR) for detection of potentially allergenic hazelnut residues in complex food matrices[J]. European Food Research and Technology, 2000. 211(5):360-365.

[21] Holzhauser T, Stephan O, Vieths S. Detection of potentially allergenic hazelnut (*Corylus avellana*) residues in food: A comparative study with DNA PCR-ELISA and protein sandwich-ELISA [J]. Journal of Agricultural and Food Chemistry, 2002, 50 (21): 5808-5815.

[22] Hird H, Lloyd J, Goodier R, et al. Detection of peanut using real-time polymerase chain reaction[J]. Food Research Technology,2003 (217):265-268.

[23] Markoulatos P, Siafakas N,Papathoma A, et al. Qualitative and quantitative detection of protein and genetic traits in genetically modified food [J]. Food Reviews International, 2004,20 (3): 275-296.

[24] Arita K, Babiker E E, Azakami H, et al. Effect of chemical and genetic attachment of polysaccharides to proteins on the production of IgG and IgE[J]. Journal of Agricultural and Food Chemistry, 2001,49(4):2030-2036.

[25] Gagnon C, Poysa V, Cober E, et al. Soybean allergens affecting north American patients identified by 2D gels and mass spectrometry[J]. Food Analytical Methods, 2010, 3 (4):363-374.

[26] 鲍男. 大豆抗原在仔猪小肠组织中分布规律的研究[D]. 长春:吉林农业大学, 2007.

[27] 张兵. 大豆抗原在不同生理阶段猪消化道组织内分布规律的研究[D]. 长春:吉林农业大学,2009.