

# $\alpha$ -半乳糖苷酶辅助饱和硫酸铵法 制备 IgG 及其活性研究

The preparation of IgG combining the method of Alpha galactose glucoside  
enzyme with saturated ammonium sulfate and its activity research

肖雪莉 张 珍 张盛贵 徐荣荣

XIAO Xue-li ZHANG Zhen ZHANG Sheng-gui XU Rong-rong

狄蕊 吕锦第 刘 雅

DI Rui LV Jin-di LIU Ya

(甘肃农业大学食品科学与工程学院, 甘肃 兰州 730070)

(College of Food Science and Technology, Gansu Agriculture University, Lanzhou, Gansu 730070, China)

**摘要:**以新鲜牦牛血为原材料,采用  $\alpha$ -半乳糖苷酶辅助饱和硫酸铵盐析处理获得免疫球蛋白 G (immunoglobulin G, IgG),选取酶解时间、酶解 pH、酶解温度、酶添加量 4 个因素,在 4 个单因素的基础上,利用响应面分析法,得到  $\alpha$ -半乳糖苷酶辅助饱和硫酸铵法制备 IgG 的最佳酶解条件。并采用 ELISA 方法检测经过酶处理后样品 IgG 活性含量。结果表明,酶解时间 2 h、酶解 pH 4.4、酶解温度 39 °C、酶添加量 5 mL (467.5 U),在该工艺条件下,IgG 的含量最高,可达 27.13 mg/mL,比不加酶处理 IgG 含量 (22.35 mg/mL) 提高了 21.39% ( $P < 0.05$ )。经过酶处理后样品 IgG 活性含量为 15.92 mg/mL,比不加酶处理 IgG 活性含量 (16.07 mg/mL) 下降了 0.93%。

**关键词:**牦牛血;  $\alpha$ -半乳糖苷酶; 饱和硫酸铵; 免疫球蛋白 G (IgG); 活性

**Abstract:** The optimized preparation conditions of the concentration of IgG in yak blood after salting out of saturated ammonium sulfate by single factor experiments, including the selection of the hydrolysis time, pH, temperature and the amount of enzyme, as well as the Central Composite experiment, was investigated in this study. The activity of IgG was detected by ELISA and analyzed by using the Response Surface analysis (RSA). The results showed that the optimal

**基金项目:**甘肃省财政厅高校基本业务项目(编号:1011JKCA179); 甘肃省农牧厅生物技术专项(编号:GNSW-2013-22); 甘肃农业大学导师基金项目; 甘肃省自然科学基金(编号:1107RGZA23)

**作者简介:**肖雪莉,女,甘肃农业大学在读硕士研究生。

**通信作者:**张珍(1971—),女,甘肃农业大学副教授,博士,硕士生导师。E-mail: 332037918@qq.com

**收稿日期:**2016-08-13

concentration of IgG was 27.13 mg/mL when hydrolyzed for at 39 °C for 2 h, and enzymolyzed at pH 4.4, using an enzyme dosage 5 mL (467.5 U), and the content of IgG was 22.35 mg/mL improve 21.28% ( $P < 0.05$ ) under this condition. Moreover, it was also found that the activated content of IgG was changed from 16.07 mg/mL to 15.92 mg/mL, decreased by 0.93%, after the treatment of enzyme.

**Keywords:** yak blood;  $\alpha$ -galactosidase; saturated ammonium sulfate; immunoglobulin G; activity

牦牛血液中有丰富的蛋白质,全血中蛋白含量为 (15.5±0.8)% (其中:血浆中为 6.9%±0.7%,血细胞中 32.7%±0.9%),是非常理想的蛋白质资源<sup>[1-2]</sup>。哺乳动物和人类的血液、组织液等液体中普遍存在 IgG, IgG 具有重要的免疫和生理调节作用<sup>[3]</sup>。目前甘肃等西部地区牦牛屠宰后牦牛血液直接排放,不但污染环境,也浪费了资源。

传统提取 IgG 的方法主要有盐析法<sup>[4]</sup>、有机溶剂沉淀法<sup>[5]</sup>、双水相法<sup>[6]</sup> 3 种,但 3 种方法只能提取 IgG 粗品。IgG 作为一种糖蛋白,其表面糖基决定了特异性抗原决定簇引起的免疫排斥效应<sup>[7]</sup>。采用  $\alpha$ -糖基转移酶去除 IgG 表面的聚糖,断裂非还原末端的  $\alpha$ -D-半乳糖苷键,水解成为 D-半乳糖、D-甘露糖等单糖<sup>[8]</sup>,暴露了与抗原结合部位,使之更易与抗原发生特异性结合,或与之结合得更紧密<sup>[9]</sup>。可有效降低免疫排斥效应从而增强免疫反应<sup>[10]</sup>,同时 IgG 在去糖基化酶处理后是否保持活性以及含量准确性的变化等问题也值得深入研究。在常规盐析法基础上去除糖基后探讨对 IgG 含量和活性的影响,在国内外相关文献中未见报道。

本试验拟以牦牛血液为原料,在饱和硫酸铵盐析处理基

基础上结合 $\alpha$ -半乳糖苷酶酶解去除 IgG 表面聚糖,研究去糖基化对 IgG 含量及活性的影响,以期为今后 IgG 免疫排斥方面提供一定的理论支持

## 1 材料与方 法

### 1.1 材料与仪器

牦牛血:甘肃南玛曲屠宰厂;

$\alpha$ -半乳糖苷酶:酶活 93.5 U/mL,美国 Sigma 公司;

牛 IgG 对照品、羊抗牛 IgG 抗体:抗体效价比 1:16~1:32,北京金生科技有限公司;

牛血清白蛋白:纯度 98%,上海中泰化学试剂有限公司;

酶联免疫试剂盒:美国 Wksu-BIO 公司;

高速冷冻离心机:H-1850R 型,长沙湘仪离心机仪器有限公司;

紫外分光光度计:UV722S 型,北京普析通用仪器有限责任公司;

酶标分析仪:RT 6000 型,美国 Thermo 公司。

### 1.2 试验方法

#### 1.2.1 工艺流程

新鲜牦牛血 $\rightarrow$ 离心(5 000 r/min,15 min) $\rightarrow$ 上清液 $\rightarrow$ 1 mol/L BaCl<sub>2</sub> $\rightarrow$ 上清液 $\rightarrow$ 饱和硫酸铵盐析 $\rightarrow$ 沉淀 $\rightarrow$ PBS 溶解 $\rightarrow$ 加酶 $\rightarrow$ 酶解 $\rightarrow$ 灭酶(基夫碱) $\rightarrow$ 透析 $\rightarrow$ 脱盐(直至透析液中无 SO<sub>4</sub><sup>2-</sup>及 NH<sub>4</sub><sup>+</sup>) $\rightarrow$ IgG

1.2.2 牦牛血清预处理 参照岳喜庆等<sup>[11]</sup>的方法,略有改动:新鲜牦牛血中加入 1/10 原血液体积浓度为 3.8% 的柠檬酸钠作为抗凝剂,混匀后,将已抗凝的血液于 4℃、5 000 r/min 条件下,离心处理 20 min,沉降血细胞,上清液即为血清,-20℃下冷藏备用。

1.2.3  $\alpha$ -半乳糖苷酶溶液的配制 将 $\alpha$ -半乳糖苷酶溶于 50 mL 3.5 mol/L(NH<sub>4</sub>)<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>、CH<sub>3</sub>COONa 缓冲液中,调整 pH 到 5.5,酶溶液的酶活为 93.5 U。

1.2.4 盐析 参照金晶<sup>[12]</sup>的方法。

1.2.5 酶解 取 5 mL 的牦牛血清,进行盐析之后,在 45℃、pH 4.5 的条件下,加入 7 mL(654.5 U)的 $\alpha$ -半乳糖苷酶进行酶解,酶解后加入 0.5 mg 的基夫碱灭酶 10 min<sup>[13]</sup>,将上述酶解产物装入透析袋,在水中透析 2 h 后,再在 PBS 缓冲液中搅拌透析,每 12 h 换液 1 次,共换 3 次,直至透析液中无 SO<sub>4</sub><sup>2-</sup>及 NH<sub>4</sub><sup>+</sup><sup>[12]</sup><sup>18-19</sup>,测定产物中 IgG 含量。

1.2.6 IgG 含量测定 参照郭斌等<sup>[14]</sup>的方法。

1.2.7 IgG 活性的测定 参照任杰等<sup>[9]</sup>的方法,修改如下:样本孔中加入待测样本 50  $\mu$ L(稀释 500 倍的样本改为稀释 600 倍)。

#### 1.2.8 单因素试验设计

(1) 酶解 pH 对 IgG 含量的影响:取 5 mL 牦牛血清经过预处理与饱和硫酸铵盐析后的样液,在酶解温度 45℃,酶解时间 3 h,酶的添加量 7 mL,酶解 pH 为 4.0,4.5,5.0,5.5,6.0 的条件下,进行酶解处理,确定最佳酶解 pH。

(2) 酶解温度对 IgG 含量的影响:取 5 mL 牦牛血清经过预处理与饱和硫酸铵盐析后的样液在 pH 4.5,酶解时间

3 h,酶的添加量 7 mL,酶解温度为 35,40,45,50,55℃的条件下,进行酶解处理,确定最佳酶解温度。

(3) 酶解时间对 IgG 含量的影响:取 5 mL 牦牛血清经过预处理与饱和硫酸铵盐析后的样液在 pH 4.5,酶解温度 45℃,酶的添加量 7 mL,酶解时间为 1,2,3,4,5 h 的条件下,进行酶解处理,确定最佳酶解时间。

(4) 酶解添加量对 IgG 含量的影响:取 5 mL 牦牛血清经过预处理与饱和硫酸铵盐析后的样液在 pH 4.5,酶解温度 45℃,酶解时间 3 h,酶的添加量为 1,3,5,7,9 mL 的条件下,进行酶解处理,确定最佳酶解添加量。

1.2.9 响应面试验设计 试验中将酶解温度、酶解时间、pH、酶添加量关键工艺参数进行优化。通过单因素试验确定各因素的影响范围,并确定各试验因素的中心水平值,采用四因素五水平二次回归正交旋转组合试验设计,以酶解温度、酶解时间、pH、酶添加量为自变量,IgG 浓度响应值,设计 4 因素 29 组试验的回归正交旋转组合的分析试验。

## 2 结果与讨论

### 2.1 IgG 含量的标准曲线

由图 1 可知,可见分光光度法测得 IgG 标准曲线为: $y=0.171 0x+0.100 0$ , $R^2=0.999 0$ ;IgG 的含量在 0.5~3.0 mg/mL 时,吸收度和含量呈良好的线性关系。

### 2.2 IgG 活性标准曲线的绘制

由图 2 可知,可见分光光度法测得 IgG 活性标准曲线为: $y=0.073 53x+0.044 9$ , $R^2=0.999 4$ ;IgG 活性含量在

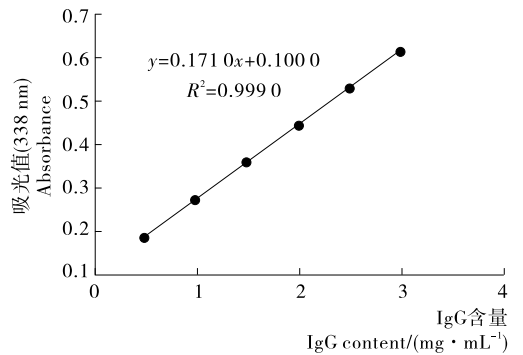


图 1 IgG 含量的标准曲线

Figure 1 The standard curve of IgG content

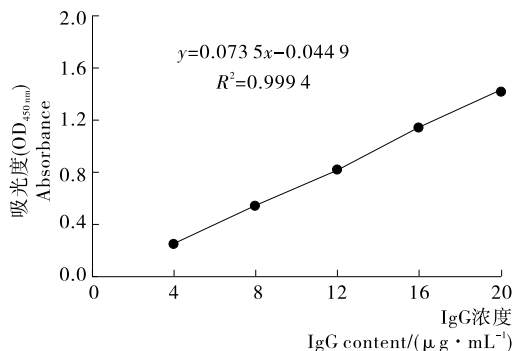


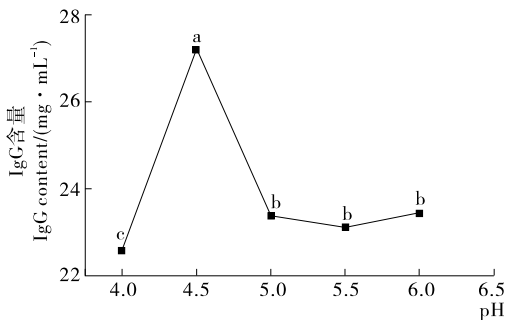
图 2 ELISA 试剂盒测定牦牛血中 IgG 的标准曲线

Figure 2 ELISA kit was developed for the determination of IgG in yak blood standard curve

4~20  $\mu\text{g}/\text{mL}$  时,吸收度和含量呈良好的线性关系。

### 2.3 单因素试验结果

2.3.1 酶解 pH 对 IgG 含量的影响 由图 3 可知,IgG 含量随着 pH 的增加呈现先增大后减小的趋势,在 pH 为 4.5 时,IgG 含量达到最大,IgG 含量为 27.19  $\text{mg}/\text{mL}$ ,并与其他水平有显著性差异( $P < 0.05$ ),在 pH 5.0,5.5,6.0 时 IgG 含量分别比 pH 为 4.5 降低了 20.47%,16.30%,15.90%,IgG 在 pH 4.0,IgG 结构变化,会发生部分变性<sup>[15]</sup>。由于 pH 在过高条件下, $\alpha$ -半乳糖苷酶的(His,Asp,Cys)极性氨基酸基团被修饰,酶活损失,影响  $\alpha$ -半乳糖苷酶的酶解 IgG 速率以及甘露糖半乳糖释放速率,综上所述,选用 pH 4.5 是较优选择。

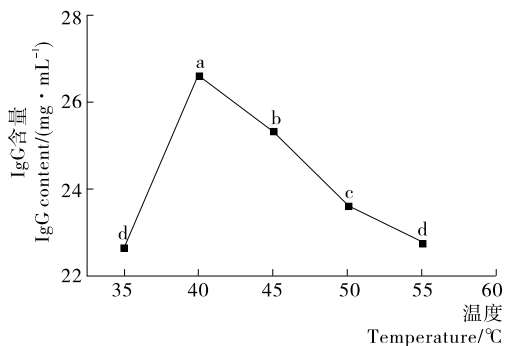


不同字母表示  $a$  值在 0.01 条件下差异显著( $P \leq 0.05$ );相同字母表示  $a$  值在 0.01 条件下差异不显著( $P > 0.05$ )

图 3 酶解 pH 对 IgG 含量的影响

Figure 3 Effect of enzymatic hydrolysis pH on the IgG content

2.3.2 酶解温度对 IgG 含量的影响 由图 4 可知,IgG 含量随着温度的提高呈现先升高后降低的趋势,温度 40  $^{\circ}\text{C}$  时,IgG 浓度达到最大,IgG 含量为 26.62  $\text{mg}/\text{mL}$  并与其他水平有差异。在温度 35  $^{\circ}\text{C}$  时,IgG 含量最低,这是因为在酸性环境中,IgG 对于温度更加敏感,开始失活的温度有所降低<sup>[16]</sup>。在温度 40  $^{\circ}\text{C}$  时,IgG 含量提高了 17.37%,这是因为温度增高,分子运动加快,溶解、扩散程度也加快,有利于有效成分的提出。但温度过高,有些有效成分被破坏,酶的活性降低,甚至失活。当温度为 45,50,55  $^{\circ}\text{C}$  时,IgG 含量相比 40  $^{\circ}\text{C}$  时



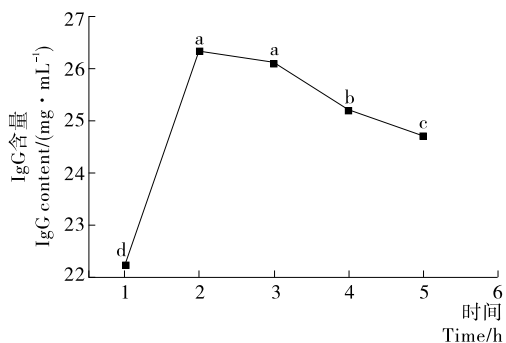
不同字母表示  $a$  值在 0.01 条件下差异显著( $P \leq 0.05$ );相同字母表示  $a$  值在 0.01 条件下差异不显著( $P > 0.05$ )

图 4 酶解温度对 IgG 含量的影响

Figure 4 Effect of enzymatic hydrolysis temperature on the IgG content

分别下降了 5.05%,12.61%,16.75%,由于随着温度的进一步升高, $\alpha$ -半乳糖苷酶的变性程度进一步加大,不利于反应的进行,酶解温度以 40  $^{\circ}\text{C}$  为宜。

2.3.3 酶解时间对 IgG 含量的影响 由图 5 可知,IgG 含量随着酶解时间的延长呈现先增大后降低的趋势,在酶解时间为 2 h 时,IgG 浓度达到最大,IgG 含量为 26.32  $\text{mg}/\text{mL}$ ,在酶解时间为 1 h 时,IgG 含量较低,这是因为酶解时间过短,反应不充分,不能完全酶解 IgG。当酶解时间为 2 h 时,IgG 含量提高了 17.76%,当酶解 3 h 时,IgG 含量下降 0.84% ( $P > 0.05$ ),与 2 h 时没有显著性差异。这是因为底物与产物已经达到溶解平衡,水解时间过长,作用底物被消耗水解度随之下降。在酶解时间为 4,5 h 时,IgG 含量分别下降了 4.44%,6.52%,这是因为随着酶解产物的增加,加快了逆反应的进行,反应速率随之下降,所以 IgG 含量也会下降,酶解时间以 2 h 为宜。

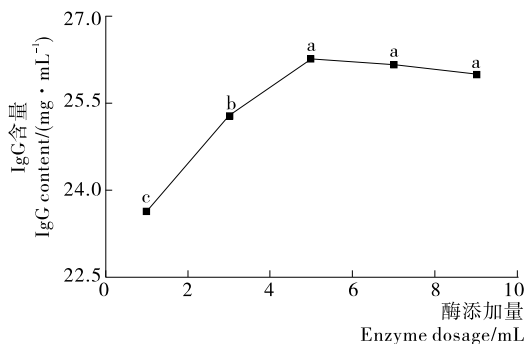


不同字母表示  $a$  值在 0.01 条件下差异显著( $P \leq 0.05$ );相同字母表示  $a$  值在 0.01 条件下差异不显著( $P > 0.05$ )

图 5 酶解时间对 IgG 含量的影响

Figure 5 Effect of enzymatic hydrolysis time on the IgG content

2.3.4 酶添加量对 IgG 含量的影响 由图 6 可知,IgG 含量随着酶添加量的加入呈现先增大后降低的趋势,在酶添加量为 5 mL 时,IgG 含量达到最大,IgG 含量为 26.27  $\text{mg}/\text{mL}$ 。酶添加量为 1 mL,IgG 含量相比 5 mL 时分别下降了 11.17%,有显著性差异( $P < 0.05$ ),这是因为随着酶添加量的



不同字母表示  $a$  值在 0.01 条件下差异显著( $P \leq 0.05$ );相同字母表示  $a$  值在 0.01 条件下差异不显著( $P > 0.05$ )

图 6 酶添加量对 IgG 含量的影响

Figure 6 Effect of add the amount of enzyme on the IgG content

升高,与底物的接触面积增大。当酶的添加量达到饱和时,继续添加酶时,底物浓度相对较低,酶与底物竞争,会对酶产生抑制作用。当酶的添加量为 7 mL 和 9 mL 时,IgG 含量分别降低了 0.42%,1.08%,同时酶解中间产物会改变盐溶液的构成,影响 IgG 的析出与酶的接触面积、副产物会导致逆反应的发生不利于 IgG 含量的进一步提高,综上所述,选用 5 mL 的酶添加量为宜。

2.4 响应面法确定  $\alpha$ -半乳糖苷酶酶解 IgG 的最佳工艺

通过单因素试验结果,选择 IgG 含量影响较大的 4 个因素时间、温度、pH、酶添加量四个因素,根据中心组合试验设计的方案及试验结果见表 1。

表 1 试验编码水平  
Table 1 Levels of test coding

水平	A 时间/h	B 温度/℃	C pH	D 酶添加量/mL
2	1.0	30	3.5	3
1	1.5	35	4.0	4
0	2.0	40	4.5	5
-1	2.5	45	5.0	6
-2	3.0	50	5.5	7

根据 Box-Behnken 的统计设计原理,以酶解温度、时间、pH 以及酶添加量对 IgG 浓度影响见表 2。以 IgG 含量值为响应值,得出酶解温度、时间、pH 以及酶添加量的编码值为自变量的四元二次回归方程:

$$Y=29.51-0.23A-0.12B-0.33C-0.042D-0.039AB-0.11AC+0.034AD+7.50E-003BC-0.069BD-0.053CD-0.42A^2-0.45B^2-0.66C^2-0.57D^2. \quad (1)$$

由表 3 可知:模型  $P < 0.0001$ ,说明此模型在统计学上极显著;决定系数( $R^2$ )为 0.9776,校正系数( $R_{adj}^2$ )为 0.9552,该模型能解释 95.52% 响应面的变化,失拟项  $P = 0.0502 > 0.05$ ,失拟项不显著,表明模型的建立较为合理。

2.4.1 响应面分析 由表 3 可知,交互作用中,时间和 pH 的交互作用对 IgG 浓度有显著影响,其他 P 值均大于 0.05,说明其显著性不明显。图 7 显示了当酶解时间一定时,随着酶解 pH 的增大,IgG 浓度呈现先增大后降低的趋势。当酶

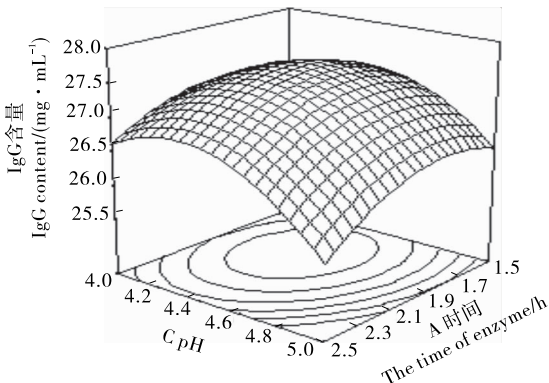


图 7 酶解 pH、酶解时间对 IgG 浓度的响应面图

Figure 7 Hydrolysis pH, time on the IgG concentration response surface

表 2 试验安排与结果

Table 2 Experimental arrangement and results

试验号	A	B	C	D	IgG 浓度/ (mg · mL <sup>-1</sup> )
1	1.00	1.00	1.00	1.00	25.99
2	-1.00	1.00	1.00	1.00	25.73
3	1.00	-1.00	1.00	1.00	25.88
4	-1.00	-1.00	1.00	1.00	25.44
5	1.00	1.00	-1.00	1.00	25.39
6	-1.00	1.00	-1.00	1.00	24.90
7	1.00	-1.00	-1.00	1.00	25.64
8	-1.00	-1.00	-1.00	1.00	24.39
9	1.00	1.00	1.00	-1.00	26.23
10	1.00	1.00	1.00	-1.00	25.87
11	1.00	-1.00	1.00	-1.00	25.73
12	-1.00	-1.00	1.00	-1.00	25.50
13	1.00	1.00	1.00	-1.00	25.54
14	-1.00	1.00	1.00	-1.00	24.79
15	1.00	-1.00	1.00	-1.00	25.00
16	-1.00	-1.00	1.00	-1.00	24.44
17	2.00	0.00	0.00	0.00	26.11
18	-2.00	0.00	0.00	0.00	25.53
19	0.00	2.00	0.00	0.00	25.79
20	0.00	-2.00	0.00	0.00	25.60
21	0.00	0.00	2.00	0.00	25.28
22	0.00	0.00	-2.00	0.00	24.47
23	0.00	0.00	0.00	2.00	25.42
24	0.00	0.00	0.00	-2.00	25.05
25	0.00	0.00	0.00	0.00	27.37
26	0.00	0.00	0.00	0.00	27.60
27	0.00	0.00	0.00	0.00	27.46
28	0.00	0.00	0.00	0.00	27.57
29	0.00	0.00	0.00	0.00	27.54

解 pH 4.30~4.50 时,IgG 浓度最大。当酶解 pH 一定时,酶解时间 1.8~2.0 h 时,IgG 浓度最大。

2.4.2 验证实验 通过对 IgG 浓度取最大值,由软件自动分析可得到 IgG 提取工艺最佳理论值;酶解时间 1.88 h、酶解温度 39.41 ℃、pH 4.39、酶添加量 4.97 mL 时,IgG 浓度为 27.58 mg/mL。考虑实际操作的方便,选取酶解时间 2 h、酶解温度 40 ℃、pH 4.4、酶添加量 5.0 mL,进行 3 次平行实验,最终 IgG 浓度为 27.13 mg/mL,与理论值较为接近,实际值比理论值降低了 1.63%,说明该数学模型的建立对牦牛血 IgG 的获取具有可行性。

2.5 未加酶处理与加酶处理提取 IgG 含量活性的对比结果

由表 4 可知,加酶处理后 IgG 含量显著提高。IgG 活性在加酶处理后未有显著性的变化,原因就在于  $\alpha$ -半乳糖苷酶是一种外切糖苷酶,酶解只能切除肽链两端的聚糖,酶解程度不大, $\alpha$ -半乳糖苷酶酶解 IgG 表面少部分聚糖以后,对活性影响不大。

表 3 响应面模型的方差分析<sup>†</sup>

Table 3 Variance analysis of response surface model

变异源	平方和	自由度	均方	F 值	P 值	显著性
模型	24.030	14	1.720	43.650	<0.000 1	* *
A	1.260	1	1.260	32.060	<0.000 1	* *
B	0.330	1	0.330	8.310	0.012 1	*
C	2.600	1	2.600	66.140	<0.000 1	* *
D	0.042	1	0.042	1.060	0.320 7	—
AB	0.024	1	0.024	0.610	0.447 4	—
AC	0.190	1	0.190	4.920	0.043 5	*
AD	0.018	1	0.018	0.460	0.507 1	—
BC	9.000E-004	1	9.000E-004	0.023	0.881 9	—
BD	0.076	1	0.076	1.920	0.187 1	—
CD	0.044	1	0.044	1.120	0.307 5	—
A <sup>2</sup>	4.630	1	4.630	117.760	<0.000 1	* *
B <sup>2</sup>	5.340	1	5.340	135.830	<0.000 1	* *
C <sup>2</sup>	11.260	1	11.260	286.320	<0.000 1	* *
D <sup>2</sup>	8.390	1	8.390	213.420	<0.000 1	* *
残差	0.550	14	0.039			
失拟项	0.520	10	0.052	5.950	0.050 2	—
纯误差	0.035	4	8.670E-003			
总和	24.580	28				

† \* \* 表示极显著,  $P < 0.01$ ; \* 表示显著,  $P < 0.05$ ; — 表示不显著,  $P > 0.05$ 。

表 4 加酶与未加酶处理 IgG 含量与活性变化<sup>†</sup>

Table 4 Changes on IgG contents and activity between enzyme treatment and no enzyme treatment mg/mL

样品	IgG 含量	IgG 活性
加酶处理	27.13 <sup>b</sup>	15.92 <sup>a</sup>
空白对照	22.35 <sup>a</sup>	16.07 <sup>a</sup>

† 同列不同字母表示在  $\alpha = 0.05$  显著水平差异显著 ( $P \leq 0.05$ ); 相同字母表示在  $\alpha = 0.05$  显著水平差异不显著 ( $P > 0.05$ )

### 3 结论

不同的酶解条件下, 添加  $\alpha$ -半乳糖苷酶对 IgG 表面聚糖进行酶解, 当酶解 pH 为 4.4, 酶解温度为 39 °C, 酶解时间为 2 h, 酶解添加量为 5 mL (酶活 467.5 U) 时, IgG 含量为 27.13 mg/mL, 比不加酶含量提高了 21.38%, 应用 ELISA 方

法检测经过酶处理后样品 IgG 活性含量为 15.92 mg/mL, 比不加酶处理 IgG (活性含量 16.07 mg/mL) 活性下降了 0.93% ( $P > 0.05$ )。综上所述, 糖基转移酶  $\alpha$ -半乳糖苷酶在酶解糖蛋白 IgG 表面聚糖提高 IgG 含量以及对活性有所影响。至于 IgG 表面聚糖去糖基化以后稳定性等问题还有待进一步研究。

### 参考文献

- [1] 于海燕, 罗永康. 牦牛生理化特性的研究[J]. 肉类研究, 2007(6): 33-36.
- [2] 朱森阳, 汪国和, 王志鹏. 畜禽血液资源的开发利用进展[J]. 养殖与饲料, 2007(1): 67-69.
- [3] SASAKI M, DAVIS C L, LARSON B L. Production and turnover of IgG1 and IgG2 immunoglobulins in the bovine around parturition.[J]. Journal of Dairy Science, 1977, 59(12): 2 046-2 055.
- [4] 照日格图, 敖长金, 斯日古楞. 羊 IgG 粗品提取方法的研究[J]. 中国饲料, 2009(12): 26-27.
- [5] 田明玉. 双水相萃取白蛋白和酶的初步研究[D]. 大连: 大连理工大学, 2009: 5-8.
- [6] 杜雨. 超声波辅助盐析法提取及双水相法提取纯化牦牛 IgG 的工艺条件研究[D]. 兰州: 甘肃农业大学, 2015: 6-8.
- [7] 章晓联. 糖基化与免疫[J]. 生命科学, 2011(7): 685-694.
- [8] 李孝辉, 陈声明. 微生物源  $\alpha$ -半乳糖苷酶的研究进展[J]. 微生物学通报, 2002(2): 71-75.
- [9] 任杰, 胡志和, 吴子健, 等. 超高压处理对牛初乳中 IgG 活性的影响[J]. 食品工业科技, 2013, 34(20): 280-283.
- [10] 陈仁芳, 邢益平, 林艳, 等. 乙型肝炎病毒表面抗原中蛋白去糖基化对体液免疫应答的影响[J]. 南京医科大学学报: 自然科学版, 2007, 27(11): 1 209-1 212.
- [11] 岳喜庆, 冯巧萍, 张和平, 等. 牛血清免疫球蛋白的盐析法提取与纯化[J]. 中国乳品工业, 2005(3): 16-21.
- [12] 金晶. 牦牛 IgG 分离纯化工艺研究[D]. 兰州: 甘肃农业大学, 2010.
- [13] 刘红霞, 苏卫, 张连峰.  $\alpha$ -半乳糖苷酶研究进展[J]. 中国比较医学杂志, 2006, 16(11): 697-720.
- [14] 郭斌. 牛初乳免疫球蛋白 G 的规模化提取关键技术及活性保持技术的研究[D]. 合肥: 安徽农业大学, 2011: 18-19.
- [15] 罗磊, 武涛, 丁霄霖. 猪血 G 型免疫球蛋白稳定性研究[J]. 食品与机械, 2006, 22(6): 20-22.
- [16] 庞晨. 牦牛 IgG 分离纯化工艺及其稳定性研究[D]. 兰州: 甘肃农业大学, 2011: 32-34.

(上接第 34 页)

- [12] OJALA T, PIETIKAINEN M, MAENPAA T. Multiresolution gray-scale and rotation invariant texture classification with local binary patterns [J]. IEEE Transactions on Pattern Analysis and Machine Intelligence, 2002, 24(7): 971-987.
- [13] HEIKKILA M, PIETIKAINEN M, SCHMID C. Description of interest regions with center-symmetric local binary patterns [J]. Computer Vision, Graphics and Image Processing, 2006, 4 338: 58-69.
- [14] LIAO S, LAW W K Max, CHUNG C S Albert. Dominant local binary patterns for texture classification [J]. IEEE Transactions

on Image Processing, 2009, 18(5): 1 107-1 118.

- [15] TAN Xiao-yang, TRIGGS B. Enhanced local texture feature sets for face recognition under difficult lighting conditions [J]. IEEE Transactions on Image Processing, 2010, 19(6): 1 635-1 650.
- [16] GUO Zheng-hua, ZHANG Lei, ZHANG David. A completed modeling of local binary pattern operator for texture classification [J]. IEEE Transactions on Image Processing, 2010, 19(6): 1 657-1 663.
- [17] 赵洋. 基于局部描述子的纹理识别方法及其在叶片识别方面的应用[D]. 合肥: 中国科技大学, 2013: 37-40.