

仪器设备简单、价廉。PCR方法需要热循环,需要使用热循环反应和结果分析等精密、贵重的仪器设备,对实验条件要求苛刻;LAMP方法为等温扩增,只需一个简单的恒温器,无需电泳,结果分析通过肉眼观察,适合现场的快速筛选和应急事件的处理。

目前所使用的沙门菌传统分离培养方法,操作繁琐、费时,不适于食品和水源的卫生监测等;传统PCR检测方法对试验条件和检测人员技术要求较高,且存在扩增后电泳造成实验环境的污染。LAMP方法作为一种快速检测沙门菌的方法具有快速、特异、简便的优点,在与传统方法的比较中 $P > 0.05$ ,说明该方法与国标法的阳性率差异无显著性,但亦存在一定的缺陷,只能作为一种初筛方法。

## 参考文献

- [1] 王丽,李琳,石磊. 食源沙门菌 DNA 环介导恒温核酸扩增法检测[J]. 中国公共卫生,2009,25(2):255-256.
- [2] 欧新华,张如胜,宋克云,等. 环介导等温扩增(LAMP)技术检测沙门菌属方法的建立[J]. 实用预防医学,2008,15(6):1945-1947.
- [3] 王丽,石磊,李琳. DNA 环介导的恒温扩增法在快速鉴定病原微生物中的应用[J]. 生命的化学,2006,26(5):462-464.
- [4] 鲁玉侠,郭祀远,石磊,等. EMA-LAMP方法快速检测死/活的食源性沙门氏菌[J]. 食品科学,2009,30(22):324-327.
- [5] 杨小龙,陈朝琼. 食品微生物快速检测技术研究进展[J]. 河北农业科学,2008,12(12):51-53.
- [6] 张如胜,魏泉. LAMP技术在病原微生物检测中的应用[J]. 华南预防医学,2007,33(5):45-49.

## 实验技术与方法

# 利用毛细管电泳法测定乳品中 $\beta$ -乳球蛋白含量的研究

孙国庆 康小红 刘卫星

(内蒙古蒙牛乳业(集团)股份有限公司研发中心,内蒙古 呼和浩特 011500)

**摘要:**目的 用毛细管电泳技术检测乳品中 $\beta$ -乳球蛋白含量。方法 将样品经缓冲液处理,选择直径为70  $\mu\text{m}$ ,有效长度600 mm的未涂层石英毛细管柱;柱温为40  $^{\circ}\text{C}$ ;缓冲溶液为柠檬酸缓冲液(pH为 $3.0 \pm 0.2$ );工作电压为27 kV;检测波长为214 nm;进样时间为5 s,进行检测。结果  $\beta$ -乳球蛋白回收率为75.2%~105.2%,相对标准偏差(RSD)为1.09%~3.10%;最低检出限为0.001 mg/ml。结论 该方法简便、准确、灵敏度高,是快速检测乳品中 $\beta$ -乳球蛋白含量较适合的分析方法。

**关键词:**毛细管电泳法;  $\beta$ -乳球蛋白; 乳制品

中图分类号:R446.62;TS252 文献标识码:A 文章编号:1004-8456(2010)05-0414-04

## Detection of $\beta$ -Lacto Globulin in Milk Products by Capillary Electrophoresis

SUN Guo-qing, KANG Xiao-hong, LIU Wei-xing

(Inner Mongolia Meng Niu Dairy Industry (Group) Co., Ltd R&D Center,  
Inner Mongolia Huhhot 011500, China)

**Abstract: Objective** To establish a capillary electrophoresis method for detecting the content of  $\beta$ -lacto globulin in dairy products. **Method** Samples were handled with buffers; an uncoated neutral capillary column in the diameter of 70  $\mu\text{m}$  and the effective length of 600 mm was used. The samples were detected under the condition of capillary temperature at 40  $^{\circ}\text{C}$ ; citric acid buffer solution at pH  $3.0 \pm 0.2$ , operating voltage at 27 kV, detection wavelength at 214 nm, and injection time for 5 s. **Results** The average recovery was 75.2% -105.2% and the relative standard deviation (RSD) was 1.09% -3.10% for  $\beta$ -lacto globulin. The detection limit was 0.001 mg/ml. **Conclusion** The method is simple, accurate and sensitive. It is suitable for fast screening and quantitative monitoring  $\beta$ -lacto globulin in dairy products.

收稿日期:2010-03-29

作者简介:孙国庆 男 研发员 研究方向为乳制品研究与开发 E-mail:sgqvictor@163.com

通信作者:康小红 女 工程师

**Key words:** Capillary Electrophoresis (CE);  $\beta$ -Lacto Globulin ( $\beta$ -Lg); Dairy Product

牛乳是日常生活中不可或缺的营养品,它含有丰富的营养物质,如酪蛋白、乳清蛋白、补体、脂肪和免疫球蛋白等。 $\beta$ -乳球蛋白( $\beta$ -lacto globulin)是一种重要的牛乳清蛋白,占总蛋白质质量分数的8%~10%,含量为2.0~4.0 mg/ml,分子量约为18 400 ku,主要由162个氨基酸所组成。其二级结构是由9个反平行的 $\beta$ -折叠和1个螺旋的分子所组成。在若干细胞及动物实验研究中发现,认为 $\beta$ -乳球蛋白的水解物质或分子修饰物,具有降胆固醇与抗氧化等生理活性<sup>[1-3]</sup>。 $\beta$ -乳球蛋白是婴儿牛乳过敏症的主要致敏原<sup>[4]</sup>。这是由于 $\beta$ -乳球蛋白被吸附在肠道黏膜上,产生免疫反应而引起过敏。所以降低 $\beta$ -乳球蛋白的含量有助于改善婴儿过敏。因此准确检测出 $\beta$ -乳球蛋白含量有非常重要的意义<sup>[5-6]</sup>。

目前,对于 $\beta$ -乳球蛋白含量检测方法的相关研究报道较少<sup>[7]</sup>。国外虽有报道<sup>[8]</sup>,但是方法操作复杂,耗时较长。本实验使用毛细管电泳仪,建立一种样品处理方便、操作简单、耗时少、精确度较高的检测方法。

## 1 材料与方法

### 1.1 材料

原料奶:从周围5个以上牧场奶站采集;巴氏牛奶:从普通超市购买5个以上不同批次产品。

三羟甲基氨基甲烷(Tris)、乙二胺四乙酸、 $\beta$ -巯基乙醇、3-吗啉代丙烷磺酸、尿素、柠檬酸、柠檬酸三钠、甲基羟乙基纤维素、羟丙基甲基纤维素、氢氧化钠均为分析纯(购自北京希凯创新科技有限公司);水为超纯水; $\beta$ -乳球蛋白标准品(美国SIGMA公司,纯度为95%)。

### 1.2 仪器

P/ACE MDQ 高压毛细管电泳仪,配有二极管阵列检测器(购自美国贝克曼库尔特公司);1875D 超声波清洗机(购自美国Crest公司),VORTEXGEMIE2 旋涡混合器(购自美国SCIENTIFIC Instruments公司),Z-36HK 台式高速冷冻离心机(购自德国Hermle公司)。

### 1.3 缓冲液的配制

1.3.1 电泳缓冲液 不同比例添加溶质,溶质浓度分别达柠檬酸0.32 mol/L;柠檬酸三钠20 mmol/L;尿素7 mol/L;羟丙基甲基纤维素0.05%;共配制100 ml,使用柠檬酸调至pH值为3.0。

1.3.2 样品缓冲液 不同比例添加溶质,溶质浓度

分别达 Tris 160 mmol/L; 3-吗啉代丙烷磺酸 40 mmol/L; 乙二胺四乙酸 60 mmol/L; 尿素 7 mol/L; 处理样品时添加 8  $\mu$ l/ml 的  $\beta$ -巯基乙醇, 甲基羟乙基纤维素 0.05%。共配置 100 ml, 使用氢氧化钠调 pH 值至 8.5。

### 1.4 标准溶液

配置 2.00 mg/ml 的  $\beta$ -乳球蛋白标准储备溶液, 分别吸取适量储备溶液依次稀释, 使其浓度分别为 1.00、0.50、0.25 和 0.12 mg/ml, 储存于常温, 全部浓度标准均限当日使用。

### 1.5 实验方法

1.5.1 电泳条件 毛细管柱选择为直径 70  $\mu$ m, 有效长度 600 mm 的未涂层石英毛细管柱; 柱温为 40  $^{\circ}$ C; 缓冲溶液为柠檬酸缓冲液 (pH 为 3.0  $\pm$  0.2); 工作电压为 27 kV; 检测波长为 214 nm; 进样时间为 5 s。

1.5.2 样品前处理 把样品装入 15 ml 的离心管中, 3 500 r/min 离心 10 min。准确提取样品 100  $\mu$ l 置入冻存管(或其他容器), 再提取 400  $\mu$ l 样品缓冲液加入冻存管(或其他容器), 混匀之后提取 40  $\mu$ l 处理好的样品加入进样管中, 使用超声波清洗 3 min, 静置备用。

1.5.3 进样容量 检测标准品和样品时采用压力进样方式, 压力选择为 0.5 psi, 进样时间为 5 s, 进样容量控制在 100 nl 以内。

1.5.4 操作步骤 备用样品放置于仪器样品槽中, 设置电泳条件后开始通电进行样品分离, 经过 30 min 后阻断电源停止样品分离, 每个样品重复 3 次, 取出样品弃掉。

1.5.5 标准曲线 将标准工作液按 0.12、0.25、0.50、1.00 和 2.00 mg/ml 浓度依次进样, 每样重复进样 3 次。按其所得的峰面积平均值与对应的标准溶液浓度做标准曲线图, 使用仪器自带软件计算回归方程和相关参数。

1.5.6 乳品中 $\beta$ -乳球蛋白含量计算 根据峰面积计算, 利用仪器自带软件进行分析。

## 2 结果

### 2.1 方法标准曲线、线性范围及精密度

将 0.12、0.25、0.50、1.00、2.00 mg/ml 等 5 种浓度标准溶液摇匀后使用高压毛细管电泳分析, 积分后的平均峰面积分别为 14 112、33 124、72 110、152 088、378 089, 利用软件得出标准曲线, 其线性回归方程为  $y = 5 \times 10^{-06}x + 0.1108$ ,  $r^2 = 0.9918$ ,

线性范围 0.12 ~ 2.00 mg/ml。分别将 0.12、0.25、0.50、1.00、2.00 mg/ml 的  $\beta$ -乳球蛋白标准溶液,连续进样 8 次,所得的 5 个浓度相对标准偏差(RSD)分别为 2.51%、1.56%、1.71%、1.09% 和 3.10%。平行处理 8 个原料奶,均为 1:6 稀释,样品前处理按照 1.5.2 进行,得出方法的 RSD 为 1.88%。

## 2.2 方法检出限

本实验检测的样品浓度为 0.12 mg/ml,基线噪音峰高为 0.00030 AU,样品峰高为 0.113 AU。通过计算公式(最低检出限 = 基线峰高  $\times$  样品浓度/样品峰高  $\times$  3)得出最低检出限为 0.001 mg/ml。

## 2.3 回收率实验

检测后的结果见表 1。这可能是浓度越高吸附得越多,造成损失越多的原因。

表 1  $\beta$ -乳球蛋白回收率

原料奶浓度 (mg/ml)	添加标准品浓度 (mg/ml)	测定值 (mg/ml)	回收率 (%)
3.50	1.00	4.25	75.2
3.50	0.80	4.14	80.3
3.50	0.50	3.94	94.3
3.50	0.25	3.76	105.2

## 2.4 实际样品测定

在最佳电泳条件下,分别对 5 种不同牧场原料奶和 5 种不同批次巴氏牛奶进行检测,测定结果见表 2。

从表 2 看出,5 种原料奶测量值均在文献范围 3.00 ~ 4.00 mg/ml<sup>[9]</sup> 之内,而巴氏牛奶平均值为 1.62 mg/ml,低于原料奶,可能加热引起其含量降

低,有关加热对  $\beta$ -乳球蛋白活性的影响有待于进一步研究。

表 2 样品中  $\beta$ -乳球蛋白含量(mg/ml)

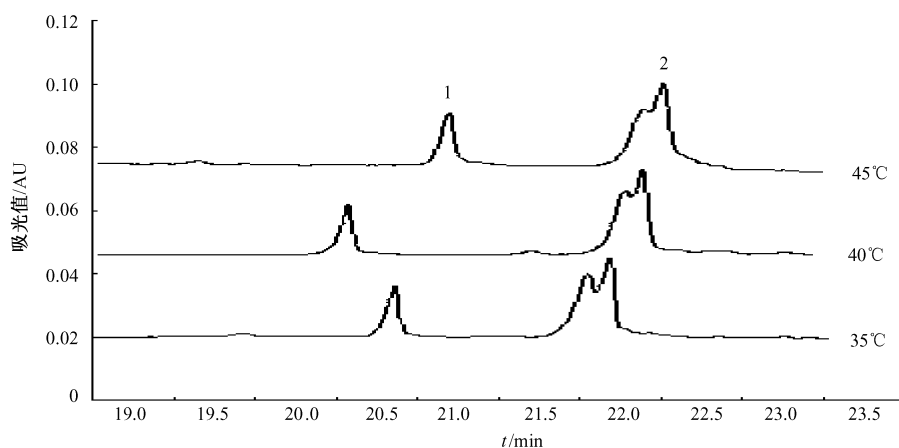
样品	测定值	文献值范围
原料奶 1	3.49	
原料奶 2	3.58	
原料奶 3	3.67	3.00 ~ 4.00 <sup>[9]</sup>
原料奶 4	3.12	
原料奶 5	3.97	
原料奶( $x \pm s$ )	3.56 $\pm$ 0.27	
巴氏牛奶 1	1.59	
巴氏牛奶 2	2.10	
巴氏牛奶 3	1.26	-
巴氏牛奶 4	1.75	
巴氏牛奶 5	1.39	
巴氏牛奶( $x \pm s$ )	1.62 $\pm$ 0.29	

注: - 表示目前尚未确定范围。

## 3 讨论

### 3.1 最佳检测温度的选择

考虑热效应、分离效率和分离介质对温度的限制等因素。热效应:避免管内溶液过热而出现气泡,显然温度低一点较好。重现性:避免温度波动。分离效率:提高分离度为目的,需要实验来测定。介质对温度限制:不同成分有不同的要求。本实验在 35、40 和 45  $^{\circ}\text{C}$  条件下对样品进行电泳分离。结果 40  $^{\circ}\text{C}$  时的分离峰比 30  $^{\circ}\text{C}$  更尖锐,比 45  $^{\circ}\text{C}$  条件峰值更清晰。所以确定未涂层毛细管以 40  $^{\circ}\text{C}$  为最佳分离温度。见图 1。



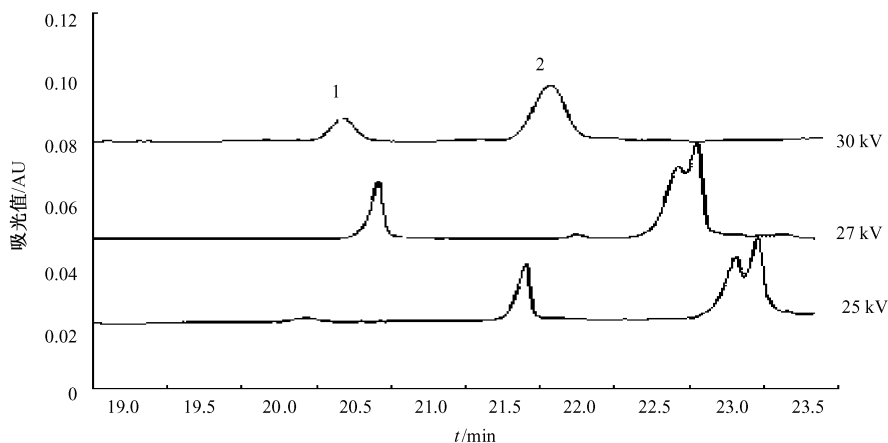
注:1 为  $\alpha$ -乳白蛋白,2 为  $\beta$ -乳球蛋白。

图 1 不同分离温度下  $\beta$ -乳球蛋白的分离图谱

### 3.2 最佳检测电压的选择

极大电压通常是最佳电压。实际分离中,如果所用的毛细管很细或缓冲液的电导很低,则极大电压可能会超出仪器的控制范围,此时没有最佳电压,可选

用仪器允许的最大输出电压。本实验在 25、27 和 30 kV 条件下对样品进行电泳分离。结果 27 kV 时的分离峰形比 25 和 30 kV 更尖锐,有利于积分。所以确定未涂层毛细管以 27 kV 为最佳分离电压。见图 2。



注:1为 $\alpha$ -乳白蛋白,2为 $\beta$ -乳球蛋白。

图2 不同分离电压下 $\beta$ -乳球蛋白检测分离图谱

#### 4 结论

本实验利用毛细管电泳技术开发出的检测乳中 $\beta$ -乳球蛋白含量的方法回收率为75.2%~105.2%;相对标准偏差为1.09%~3.1%;最低检出限为0.001 mg/ml。该方法简便,准确,灵敏度高,可快速检测乳品中 $\beta$ -乳球蛋白含量。

#### 参考文献

- [1] MIRGAB F, BOUHALLAB S. Modification of bovine  $\beta$ -lactoglobulin by glycation in a powdered state or in aqueous solution: Effect on association behavior and protein conformation [J]. Agric Food Chem, 1999, 47:83-91.
- [2] de JOHN H, de GROOT J. Mild isolation procedure discloses new protein structural properties of  $\beta$ -lactoglobulin [J]. Dairy Sci, 2001, 84:562-571.
- [3] KONRAD G, FABER W. A large-scale isolation of native  $\beta$ -lactoglobulin: Characterization of physicochemical properties and comparison with other methods [J]. Int Dairy, 2000(10):713-721.
- [4] CHEN W L, WANG M T H, LIAU C Y, et al.  $\beta$ -Lactoglobulin is a thermal marker in processed milk as studied by electrophoresis and circular dichroic spectra [J]. Dairy Sci, 2005, 88:1618-1630.
- [5] CHEVALIER F, HAERTLE T. Scavenging of free radicals antimicrobial and cytotoxic activities of the Maillard reaction products of  $\beta$ -lactoglobulin glycosylated with several sugars [J]. Agric Food Chem, 2001, 49:5031-5038.
- [6] ELIAS J, CLEMENTS D M C. Antioxidant activity of cysteine, tryptophan, and methionine residues in continuous phase  $\beta$ -lactoglobulin in oil-in-water emulsions [J]. Agric Food Chem, 2005, 53:10248-10253.
- [7] LALEYE L, JOBE B. Comparative study on heat stability and functionality of camel and bovine milk whey proteins [J]. Dairy Sci, 2008, 91: 4527-4534.
- [8] 庞广昌,陈庆森,胡志和,等. 乳品安全性和乳品检测技术 [M]. 北京:科技出版社,2005:447-460.
- [9] KROEKER E M, NG-KWAI-HANG K F, HAYES J F, et al. Effect of  $\beta$ -lactoglobulin variant and environmental factors on variation in the detailed composition of bovine milk serum proteins [J]. Dairy Sci, 2004, 68: 1637-1641.

公告栏

## 中华人民共和国卫生部公告

2010年 第12号

根据《中华人民共和国食品安全法》和卫生部等9部门《关于加强食品添加剂监督管理工作的通知》(卫监督发[2009]89号)规定,经审核,现公布磷酸酯双淀粉等14个食品添加剂的质量规格标准。

特此公告。

附件:磷酸酯双淀粉等14个食品添加剂的质量规格标准(略)

二〇一〇年七月十九日