

ICS 67.050

CCS X04



中国营养保健食品协会团体标准

T/CNHFA 003—2022

乳及乳制品中牛乳酪蛋白成分定性检测 毛细管凝胶电泳法

Qualitative detection of bovine milk casein in milk and dairy products—
Capillary gel electrophoresis method

2022 - 06 - 22 发布

2022 - 07 - 01 实施

中国营养保健食品协会发布 发布

前 言

本文件按照GB/T 1.1—2020《标准化工作导则 第1部分：标准化文件的结构和起草规则》的规定起草。

请注意本文件的某些内容可能涉及专利。本文件的发布机构不承担识别这些专利的责任。

本文件由海普诺凯营养品有限公司提出。

本文件由中国营养保健食品协会归口。

本文件起草单位：海普诺凯营养品有限公司、中国检验检疫科学研究院、中国检验检疫科学研究院粤港澳大湾区研究院。

本文件主要起草人：吴桐、刘鸣畅、侯艳梅、杨艳歌、吴亚君、王云帆、王洪越、蔡亚杰、王迎春、王帅、吴占文。

乳及乳制品中牛乳酪蛋白成分定性检测 毛细管凝胶电泳法

1 范围

本文件规定了牛乳、羊乳及其制品中牛乳酪蛋白成分毛细管凝胶电泳定性检测法，方法的最低检出限为1%（配料质量比）。

本文件适用于牛乳、羊乳及其制品中牛乳酪蛋白成分的定性检测，适用的产品类别包括液态乳（巴氏杀菌乳、高温杀菌乳、调制乳、灭菌乳、发酵乳）、乳粉（全脂乳粉、脱脂乳粉、部分脱脂乳粉、调制乳粉、乳清粉）、婴幼儿配方乳粉等。

2 规范性引用文件

下列文件中的内容通过文中的规范性引用而构成本文件必不可少的条款。其中，注日期的引用文件，仅该日期对应的版本适用于本文件；不注日期的引用文件，其最新版本（包括所有的修改单）适用于本文件。

GB 19489 实验室 生物安全通用要求

GB/T 6682 分析实验室用水规格和试验方法

GB/T 27403 实验室质量控制规范 食品分子生物学检验

3 术语和定义

下列术语和定义适用于本文件。

3.1

毛细管凝胶电泳 Capillary gel electrophoresis (CGE)

将起分子筛作用的凝胶聚合物灌注于毛细管中，以高压直流电场为驱动力的对生物大分子进行分析检测的技术。

4 缩略语

下列缩略语适用于本文件。

4.1 kD: kilodalton, 千道尔顿。

4.2 SDS: Sodium dodecyl sulfate, 十二烷基硫酸钠。

4.3 Tris: Tris (Hydroxymethyl) aminomethane, 三羟甲基氨基甲烷。

5 生物安全措施

为了保护实验室人员的安全和防止污染，应由具备资格的工作人员检测，所有生物安全防护的设施、设备和安全管理的基本要求按照GB 19489有关规定执行。

6 方法原理

基于毛细管凝胶电泳的检测原理是通过SDS对样品中蛋白质组分进行变性和附加电荷的处理，采用毛细管电泳仪对蛋白质组分进行分离，依据牛乳酪蛋白特异性蛋白峰的信号，判定样品是否含有牛乳来源酪蛋白成分。

7 仪器设备

7.1 毛细管电泳仪：配备二极管阵列检测器或相同功能的仪器。

- 7.2 分析天平：精度 0.1 mg。
- 7.3 水浴锅。
- 7.4 离心机：离心力 $\geq 12000 g$ 。
- 7.5 微量移液器：0.5 μL ~10 μL ，10 μL ~100 μL ，20 μL ~200 μL ，100 μL ~1000 μL 。
- 7.6 涡旋混匀仪。
- 7.7 恒温孵育器。
- 7.8 pH 计。

8 毛细管凝胶电泳测定方法

8.1 方法提要

对于实时荧光PCR检出牛源性DNA成分的样品，可进一步采用毛细管凝胶电泳法检测牛源性酪蛋白成分。

8.2 试剂和材料

- 8.2.1 β -巯基乙醇。
- 8.2.2 十二烷基磺酸钠（SDS）。
- 8.2.3 SDS-MW 凝胶缓冲溶液：pH=8，0.2% SDS 140 mL。
- 8.2.4 SDS-MW 样品缓冲液：100 mmol/L Tris-HCl（pH 9.0），1% SDS 50 mL。
- 8.2.5 10 kD 蛋白内标，5 mg/mL，0.4 mL。
- 8.2.6 分子量标记蛋白组标样（10 kD~225 kD），16 mg/mL，100 μL 。
- 8.2.7 0.1 mol/L HCl 溶液：100 mL，室温避光贮存。
- 8.2.8 0.1 mol/L NaOH 溶液：100 mL，室温避光贮存。
- 8.2.9 毛细管电泳分析预备液：以 SDS-MW 样品缓冲液与 10 kD 蛋白内标为 84:1 的体积比例，按照当天准备分析样品数量加一的数量配制毛细管电泳分析预备液。

8.3 制样

8.3.1 干粉或固态样品制备

称取一定量固态样品（配方乳粉、全脂乳粉 500 mg，乳清蛋白粉、脱脂乳粉、乳酪样品 135 mg），置于 10 mL 离心管中，加入水到 5 mL 刻度，涡旋振荡，至充分溶解并混合均匀（含有大约 15 mg/mL 蛋白质），其中乳酪样品需在涡旋震荡前超声溶解 5 分钟。

8.3.2 反应液配制

用移液器将 10 μL 制备的样品溶液或液态乳样品（巴氏杀菌乳、高温杀菌乳、调制乳、灭菌乳、发酵乳），移入至 2.0 mL 离心管中，然后相继加入 85 μL 毛细电泳分析预备液、5 μL β -巯基乙醇，混合并涡旋振荡，盖紧瓶盖。

8.3.3 沸水浴

样品在 100°C 水浴中加热 10 min，冷却样品至室温，快速离心，使液体聚集至管底。

8.3.4 上样

涡旋振荡，用移液器将 90 μL 样品转移至 200 μL PCR 管底部，注意避免气泡产生。将微量样品管插入通用样品瓶内，使用通用瓶盖并盖紧。

8.3.5 样品检测时限

样品在 24 h 内可以保持稳定。

8.4 电泳参数

- a) 非涂层石英毛细管：50 μm \times 30 cm（有效长度：20 cm）；
- b) 检测器：二极管阵列（PDA），检测波长：220 nm；
- c) 运行电压：-15 kV（484 V/cm）；
- d) 毛细管温控：20 $^{\circ}\text{C} \pm 2^{\circ}\text{C}$ ；
- e) 样品温控：20 $^{\circ}\text{C} \pm 2^{\circ}\text{C}$ ；
- f) 电进样：5 kV，20 s；
- g) 窗口狭缝：2（100 $\mu\text{m} \times 200 \mu\text{m}$ ）。

8.5 电泳程序

8.5.1 平衡程序

30 psi下0.1 mol/L NaOH碱洗10 min，30 psi下0.1 mol/L HCl酸洗5 min，30 psi下去离子水冲洗5 min，50 psi下SDS凝胶灌注10 min，5.0 kV电压分离10 min，采用检测器为光电二极管阵列（PDA）检测器，在4 $^{\circ}\text{C}$ 条件下运行。

8.5.2 电泳程序

50 psi下0.1 mol/L NaOH碱洗5 min，50 psi下0.1 mol/L HCl酸洗2 min，50 psi下去离子水冲洗2 min，50 psi下SDS凝胶灌注10 min，5.0 kV电压上样20 s，5.0 kV电压分离30 min，采用检测器为光电二极管阵列（PDA）检测器，在4 $^{\circ}\text{C}$ 条件下检测，获取数据。

8.6 质量控制

- a) 用分子量标记蛋白组标样测试系统适用性：
 - 1) 系统适用性的验收条件为：蛋白内标的迁移时间应该在 12.3 min \pm 0.5 min
 - 2) 七个分子量标记蛋白（10 kD、20 kD、35 kD、50 kD、100 kD、150 kD 和 225 kD）应该在 30 min 内彻底分离。
- b) 单针运行可接受标准：内标峰的迁移时间应在 12.3 min \pm 0.5 min。
- c) 以牛乳为阳性对照品，羊乳为阴性对照品，水为空白对照品。
 - 1) 阳性对照品和阴性对照品的蛋白峰图谱与标准图谱（见附录 A）一致；
 - 2) 空白对照不出现蛋白峰。

8.7 结果判断与表述

8.7.1 结果判定

在符合质量控制的情况下，被检样品出现与牛乳特征性酪蛋白峰位置一致的蛋白峰，则判定为阳性，否则判定阴性。

8.7.2 结果表述

- a) 样品阳性，表述为“检出牛乳源性酪蛋白成分”；
- b) 样品阴性，表述为“未检出牛乳源性酪蛋白成分”。

9 防止污染措施

防止污染措施应符合GB/T 27403附录D的规定。

附录 A
附录 B
(规范性)
毛细管电泳标准图谱

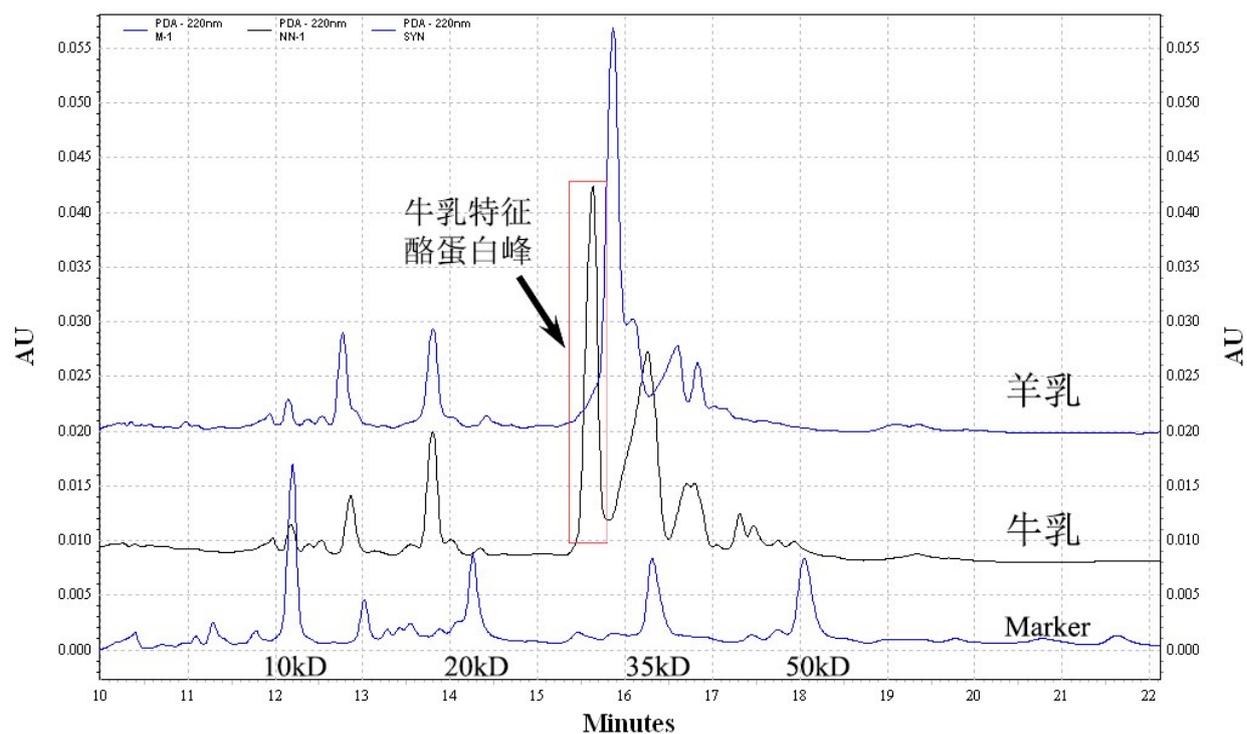


图 A. 1 毛细管电泳标准图谱