



中华人民共和国国家标准

GB/T 38578—2020

水产源致敏性蛋白快速检测 毛细管电泳法

Rapid determination of the allergenic protein from aquatic animals origin—
Capillary electrophoresis

2020-03-31 发布

2020-03-31 实施



国家市场监督管理总局 发布
国家标准化管理委员会



中华人民共和国国家标准

GB 19001-2000

质量管理体系 要求

ISO 9001:2000

本标准等同采用国际标准 ISO 9001:2000《质量管理体系 要求》。

本标准与 ISO 9001:2000 相比，主要变化如下：

——增加了“质量管理体系”一章，对质量管理体系的要求进行了详细规定；

——增加了“质量管理体系文件”一章，对质量管理体系文件的要求进行了详细规定；

——增加了“质量管理体系实施”一章，对质量管理体系实施的要求进行了详细规定；

——增加了“质量管理体系评价”一章，对质量管理体系评价的要求进行了详细规定；

——增加了“质量管理体系改进”一章，对质量管理体系改进的要求进行了详细规定；

——增加了“质量管理体系认证”一章，对质量管理体系认证的要求进行了详细规定；

——增加了“质量管理体系审核”一章，对质量管理体系审核的要求进行了详细规定；

——增加了“质量管理体系监督”一章，对质量管理体系监督的要求进行了详细规定；

前 言

本标准按照 GB/T 1.1—2009 给出的规则起草。

本标准由中国标准化研究院提出并归口。

本标准起草单位：中国标准化研究院、绿城农科检测技术有限公司、浙江工商大学、北京工商大学、北京萨姆伯科技有限公司、集美大学、湖南农业大学、温州大学、荣成市华通海洋生物科技有限公司。

本标准主要起草人：马爱进、王川丕、何晓明、周瑾茹、傅玲琳、贾英民、吴琦、郝帅、刘光明、周辉、陈孝敬、王翀、刘翼翔、刘忠甫、王彦波。

附录 A 附录 A

附录 A 附录 A

附录 A 附录 A

附录 A 附录 A

附录 A 附录 A

附录 A 附录 A

附录 A 附录 A

附录 A 附录 A

水产源致敏性蛋白快速检测 毛细管电泳法

1 范围

本标准规定了用毛细管电泳法测定水产源致敏性蛋白的方法。

本标准适用于甲壳类原肌球蛋白、甲壳类精氨酸激酶和鱼类小清蛋白含量的快速检测。

2 规范性引用文件

下列文件对于本文件的应用是必不可少的。凡是注日期的引用文件,仅注日期的版本适用于本文件。凡是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/T 6682 分析实验室用水规格和试验方法

GB/T 30891 水产品抽样规范

3 术语和定义

下列术语和定义适用于本文件。

3.1

致敏性蛋白 allergenic protein

能够使机体产生过敏反应的蛋白质。

4 原理

试样中的致敏性蛋白经蛋白提取液提取和阴离子交换层析纯化,采用毛细管电泳法测定,迁移时间定性,外标法定量。

5 试剂或材料

除非另有规定,仅使用分析纯试剂。

5.1 水

GB/T 6682 规定的一级水。

5.2 甲醇

色谱纯。

5.3 三羟甲基氨基甲烷-盐酸缓冲液

三羟甲基氨基甲烷 1.21 g,加 900 mL 双蒸水溶解,用 6 mol/L 盐酸溶液调 pH 至 7.5,用蒸馏水定容至 1 000 mL,用 0.45 μm 滤膜过滤,超声震荡(功率 200 W)30 min,室温保存。

GB/T 38578—2020.

5.4 氯化钠溶液

氯化钠 14.61 g, 适量去离子水溶解, 定容至 500 mL, 用 0.45 μm 滤膜过滤, 超声震荡(功率 200 W) 30 min, 室温保存。

5.5 磷酸盐缓冲液

氯化钠 8.00 g, 氯化钾 0.20 g, 磷酸氢二钠 1.44 g, 磷酸二氢钾 0.24 g, 将上列试剂加入定量容器中, 蒸馏水溶解后定容至 1 000 mL, 用 6 mol/L 盐酸溶液调 pH 至 7.4, 用 0.45 μm 滤膜过滤, 超声震荡(功率 200 W) 30 min, 室温保存。

5.6 虾原肌球蛋白标准样品

纯度 $\geq 98\%$ 。

5.7 虾精氨酸激酶标准样品

纯度 $\geq 98\%$ 。

5.8 鱼小清蛋白

纯度 $\geq 98\%$ 。

5.9 标准品储备液

致敏性蛋白标准品(虾原肌球蛋白、虾精氨酸激酶、鱼小清蛋白)0.001 0 g, 加入 1 mL 磷酸盐缓冲液于 1.5 mL 离心管中, 漩涡震荡混匀, 制得 1 mg/mL 蛋白标准储备液, 每 100 μL 分装成 1 管, 冻存于 $-20\text{ }^{\circ}\text{C}$ 。

5.10 1 mol/L 氢氧化钠溶液

氢氧化钠 4.00 g, 适量双蒸水溶解后定容至 100 mL, 用 0.45 μm 滤膜过滤, 超声震荡(功率 200 W) 30 min, 室温保存。

5.11 0.1 mol/L 氢氧化钠溶液

氢氧化钠 0.400 g, 适量双蒸水溶解后定容至 100 mL, 用 0.45 μm 滤膜过滤, 超声震荡(功率 200 W) 30 min, 室温保存。

5.12 硼酸-硼砂缓冲溶液

精密称取四硼酸钠($\text{Na}_2\text{B}_4\text{O}_7 \cdot 10\text{H}_2\text{O}$)0.952 5 g, 加入 80 mL 双蒸水溶解, 用 1 mol/L 氢氧化钠溶液调 pH 至 9.2, 用双蒸水定容至 100 mL, 用 0.45 μm 滤膜过滤, 超声震荡(功率 200 W) 30 min, 室温保存。

5.13 标准品工作液

吸取标准品储备液 5 μL 、10 μL 、25 μL 、40 μL 、50 μL , 分别置于 5 个 1.5 mL 塑料离心管, 加入 1 mL 磷酸盐缓冲液, 漩涡震荡混匀, 每种标准品工作液的质量浓度均为 5 $\mu\text{g/mL}$ 、10 $\mu\text{g/mL}$ 、25 $\mu\text{g/mL}$ 、40 $\mu\text{g/mL}$ 、50 $\mu\text{g/mL}$, $4\text{ }^{\circ}\text{C}$ 保存 2 周。

5.14 苯甲基磺酰氟溶液

苯甲基磺酰氟 0.174 g, 溶于 10 mL 异丙醇, 漩涡震荡混匀, 保存于 $-20\text{ }^{\circ}\text{C}$ 。

5.15 蛋白提取液

在预冷的 1 mL 裂解液中分别加入 1 μ L 蛋白酶抑制剂、10 μ L 磷酸酶抑制剂及 5 μ L 0.1 mol/L 苯甲基磺酰氟溶液,混匀后置冰上保存待用。

6 仪器设备

6.1 高效毛细管电泳仪:配有波长范围为 214 nm~220 nm 的紫外检测器、正极高压组件、石英毛细管(总长 45 cm,内径 75 μ m)。

6.2 低温离心机:13 000 g。

6.3 pH 计:精密度 0.01。

6.4 微孔滤膜:0.45 μ m,水相。

6.5 分析天平:感量 0.01 g、0.001 g 和 0.000 1 g。

6.6 蛋白纯化仪:配有自动分部收集器。

7 试验条件

7.1 毛细管柱处理方法

新毛细管柱活化。依次用甲醇冲洗 10 min,蒸馏水冲洗 5 min,0.1 mol/L 氢氧化钠溶液冲洗 30 min,蒸馏水冲洗 5 min,最后再用硼酸-硼砂缓冲溶液冲洗 20 min。

每种样品分析前,用硼酸-硼砂缓冲溶液冲洗毛细管 5 min。试验后,依次用蒸馏水冲洗 3 min,0.1 mol/L 氢氧化钠溶液冲洗 5 min,蒸馏水冲洗 3 min。

7.2 测试操作条件

测试操作条件见表 1。

表 1 测试操作条件

参数		鱼类小清蛋白	甲壳类原肌球蛋白	甲壳类精氨酸激酶
波长/nm		214		
温度/℃		25		
进样条件	进样压力/Pa	3 447.5		
	进样时间/s	5		
分析条件	分离电压/kV	15	15	18
	检测时间/min	10~15	10~15	10~15

8 样品制备

按 GB/T 30891 规定,抽取具有代表性的水产源样本至少 500 g,用四分法缩减至 100 g;放置冰上,切成糜状,用液氮研磨至粉末状,低温保存备用。

9 试验步骤

9.1 蛋白提取

快速称取研磨后的样品 0.100 g 放入 1.5 mL 预冷离心管内,加入 1.0 mL 蛋白提取液,漩涡混匀后 4 ℃ 静置 2 h,10 000 r/min,4 ℃ 离心 5 min,取上清液,分装保存于一 80 ℃,应避免反复冻融。提取蛋白上清液后,再用阴离子交换层析(1 mL DEAE sepharose F.F.预装柱)纯化蛋白上清液,2 mL 蛋白上清液以 0.5 mL/min 的流速上样,再用 40 mL 0.01 mol/L 三羟甲基氨基甲烷-盐酸缓冲液和 0.5 mol/L 氯化钠溶液线性洗脱,洗脱速度为 1 mL/min,根据出峰情况,收集蛋白洗脱液,所得样品一 80 ℃ 冷冻备用。

9.2 蛋白提取率测定

在按第 8 章处理好的样品中,加入 1 mg 致敏性蛋白标准品,用液氮研磨至粉末状。快速称取研磨后的加标样品 0.100 g 放入 1.5 mL 预冷离心管内,加入 1.0 mL 蛋白提取液,漩涡混匀后 4 ℃ 静置 2 h,10 000 r/min,4 ℃ 离心 5 min,取上清液,分装保存于一 80 ℃,应避免反复冻融。提取蛋白上清液后,再用阴离子交换层析(1 mL DEAE sepharose F.F.预装柱)纯化蛋白上清液,2 mL 蛋白上清液以 0.5 mL/min 的流速上样,再用 40 mL 0.01 mol/L 三羟甲基氨基甲烷-盐酸缓冲液和 0.5 mol/L 氯化钠溶液线性洗脱,洗脱速度为 1 mL/min,根据出峰情况,收集蛋白洗脱液,所得加标样品一 80 ℃ 冷冻备用。采用 BCA 法测定样品和加标样品的蛋白含量。

蛋白提取率按式(1)计算:

$$X = \frac{\rho_1 \times V_1}{\rho_0 \times V_0 + m} \quad \dots\dots\dots(1)$$

式中:

X —— 蛋白提取率, %;

ρ_1 —— 加标样品液蛋白质量浓度,单位为微克每毫升($\mu\text{g/mL}$);

V_1 —— 加标样品液体积,单位为毫升(mL);

ρ_0 —— 样品液蛋白质量浓度,单位为微克每毫升($\mu\text{g/mL}$);

V_0 —— 样品液体积,单位为毫升(mL);

m —— 致敏性蛋白标准品质量,单位为毫克(mg)。

9.3 测定

9.3.1 取样品液 200 μL 置于样品瓶中,压力进样 5 s 后,采用毛细管电泳法分离测定,分析时间为 10 min~15 min。

9.3.2 采用外标校准曲线法定量测定。以系列致敏性蛋白标准溶液质量浓度为横坐标,毛细管电泳峰面积为纵坐标,作标准曲线线性回归方程,样品的峰面积与标准曲线比较定量。标准溶液和样品提取液中致敏性蛋白的响应值应在仪器测定的线性范围内。标准溶液毛细管电泳图参见附录 A。

9.3.3 如果样品中的质量浓度超过了标准曲线的最高点,进一步对样品进行稀释。

9.3.4 每个测试溶液至少 2 张电泳图。

9.3.5 在进行 3 个~5 个样品检测后,应在仪器进出口换上新的硼酸-硼砂缓冲溶液。

10 结果计算

10.1 致敏性蛋白含量按式(2)计算:

$$\rho = \frac{\rho_i \times V}{m \times X} \dots\dots\dots (2)$$

式中:

ρ ——致敏性蛋白的含量,单位为毫克每克(mg/g);

ρ_i ——样品液中致敏性蛋白含量,单位为微克每毫升($\mu\text{g/mL}$);

V ——样品液体积,单位为毫升(mL);

m ——样品质量,单位为克(g);

X ——蛋白提取率,%。

10.2 计算结果以平行测定值的算术平均值表示,保留两位有效数字。

附录 A
(资料性附录)
标准溶液毛细管电泳图

A.1 原肌球蛋白毛细管电泳图见图 A.1。

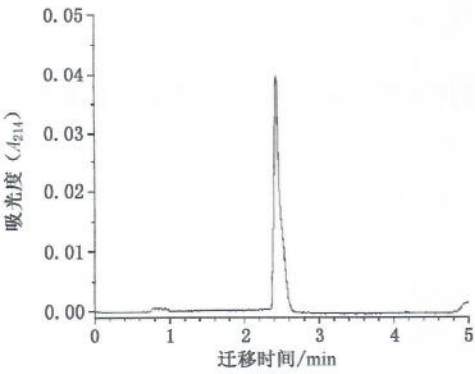


图 A.1 原肌球蛋白毛细管电泳图

A.2 精氨酸激酶毛细管电泳图见图 A.2。

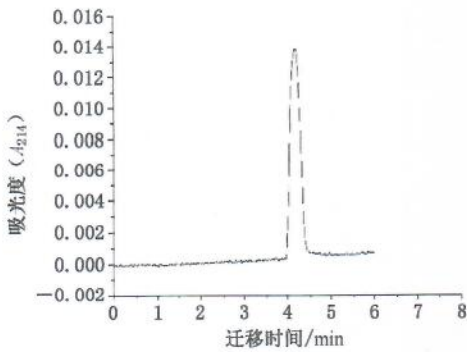


图 A.2 精氨酸激酶毛细管电泳图

A.3 小清蛋白毛细管电泳图见图 A.3。

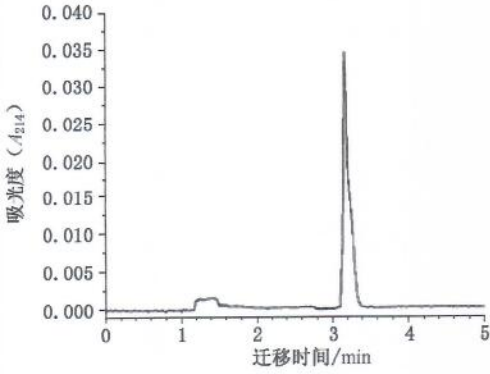


图 A.3 小清蛋白毛细管电泳图

中 华 人 民 共 和 国
国 家 标 准
水产源致敏性蛋白快速检测
毛细管电泳法
GB/T 38578—2020

*

中国标准出版社出版发行
北京市朝阳区和平里西街甲2号(100029)
北京市西城区三里河北街16号(100045)
网址 www.spc.net.cn
总编室:(010)68533533 发行中心:(010)51780238
读者服务部:(010)68523946
中国标准出版社秦皇岛印刷厂印刷
各地新华书店经销

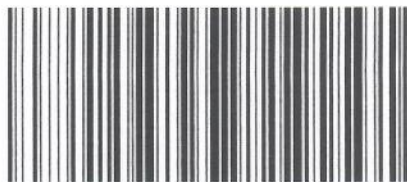
*

开本 880×1230 1/16 印张 0.75 字数 14 千字
2020年3月第一版 2020年3月第一次印刷

*

书号: 155066 · 1-64026 定价 16.00 元

如有印装差错 由本社发行中心调换
版权专有 侵权必究
举报电话:(010)68510107



GB/T 38578—2020