**国家市场监督管理总局**

**中国国家标准化管理委员会**

发布

GB/T XXXXX—201X

中华人民共和国国家标准

ICS 07.080

A 21

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

（征求意见稿）



发布

201X-XX-XX 发布

201X-XX-XX实施

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：

本标准主要起草人：

**水产源致敏性蛋白快速检测 毛细管电泳法**

1 范围

本标准规定了水生动物源水产食品原料典型致敏性蛋白含量的高效毛细管电泳快速测定的原理、试剂或材料、仪器设备、测定步骤、结果计算。

本标准适用于甲壳类水生动物源原肌球蛋白和精氨酸激酶和鱼类水生动物源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 8170 数值修约规则与极限数值的表示和判定

GB/T 6682 分析实验室用水规格和试验方法

3 术语和定义

下列术语和定义适用于本文件。

3.1

食物过敏 food Allergy

免疫机制介导的食物不良反应，即致敏性蛋白引起的异常或过强的免疫反应，可由IgE或非IgE介导。

3.2

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

毛细管电泳以高压电场为驱动力，以毛细管为分离通道，依据样品中各组分之间淌度和分配行为的差异而实现分离的一类液相分离技术。通过致敏性蛋白在毛细管中的不同迁移行为，对被测样品中致敏性蛋白的迁移时间进行检测，实现对致敏性蛋白的定性检测。毛细管电泳中致敏性蛋白的响应强度与致敏性蛋白的含量呈线性关系，将响应强度与致敏性蛋白含量建立标准曲线，以致敏性蛋白的谱峰面积代表过敏原的实际量，通过标准曲线计算得到被测水生动物源水产原料致敏性蛋白的含量。

5 试剂或材料

除另有规定外，所有试剂均为分析纯.

5.1 GB/T 6682一级。

5.2 甲醇（CH3OH）：色谱纯。

5.3 0.01 mol/L Tris-盐酸缓冲液,pH 7.5

Tris(三羟甲基氨基甲烷) 1.21 g，加900 mL双蒸水溶解，用6 M HCl调pH至7.5，用蒸馏水定容至1000 mL，用0.45 μm滤膜过滤，超声震荡30 min，室温保存。

5.4 0.5 mol/L NaCl溶液

NaCl 14.61g，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30 min，室温保存。

5.5 PBS缓冲液

NaCl 8.00 g ，KCl 0.20 g，Na2HPO4 1.44 g，KH2PO4 0.24 g，将上列试剂加入定量容器中，蒸馏水溶解后定容至 1000 mL， 用盐酸调pH 值至7.4，用0.45 μm滤膜过滤，超声震荡30 min，室温保存。

5.6 标准品储备液配制

致敏蛋白标准品（虾原肌球蛋白、虾精氨酸激酶、鱼小清蛋白）1 mg，加入1 mL PBS于1.5 mL塑料离心管中，漩涡震荡混匀，制得1 mg/mL蛋白标准储备液，每100 μL分装冻存于-20℃。

5.7 0.1 mol/L NaOH溶液

NaOH 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30 min，室温保存。

5.8 25 mmol/L 硼酸-硼砂缓冲溶液，pH 9.2

精密称取0.9525 g四硼酸钠，加入80 mL双蒸水溶解，用1 mol/L NaOH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30 min，室温保存。

6 仪器设备

6.1 高效毛细管电泳仪，配有紫外检测器。

6.2 冷冻离心机：12000 r/min，4 ℃。

6.3 涡旋振荡器。

6.4 酶标仪。

6.5 pH计：精密度0.01。

6.6 微孔滤膜：0.45 μm，水相。

6.7 分析天平：感量0.01 g和0.0001 g。

6.8 蛋白纯化仪。

7 测定步骤

7.1 试样制备

水生动物源样本用液氮研磨至粉末状。

7.2 提取

蛋白提取液配制：在预冷的1 mLLysisBuffer中分别加入1 μL蛋白酶抑制剂、10 μL磷酸酶抑制剂及5 μL 100 mM 苯甲基磺酰氟，混匀后置冰上保存数分钟待用。

快速称取研磨后的样品（0.100 ± 0.001）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，10000 r/min，4 ℃离心5 min，取上清液，分装保存于-80 ℃，应避免反复冻融。提取蛋白浸液后，再用阴离子交换层析纯化蛋白浸液，2 mL蛋白浸液以0.5 mL/min的流速上样，再用40 mL 0.01 mol/L Tris-盐酸缓冲液和0.5 mol/L NaCI溶液线性洗脱，洗脱速度为1 mL/min，收集虾蛋白洗脱液第1~5管，用以测定虾精氨酸激酶；收集虾蛋白洗脱液第10~15管，用以测定虾原肌球蛋白；收集鱼蛋白洗脱液第1~5管，用以测定鱼小清蛋白，所得样品冷藏备用（-80 ℃）。

7.3 毛细管电泳参考条件

7.3.1 毛细管冲洗方法

选用未涂层石英毛细管柱（45 cm×75 μm），新毛细管柱先依次用甲醇冲洗10 min，蒸馏水冲洗5 min，0.1 M NaOH溶液冲洗30 min，蒸馏水冲洗5 min，最后再用运行缓冲液冲洗20 min；进样前运行缓冲液冲洗5 min。

7.3.2 实验参数及条件

检测波长是214 nm，进样方式为压力进样（0.5 psi，5s），25 ℃；鱼小清蛋白和虾原肌球蛋白的最佳分离条件为分离电压15 kV，运行缓冲液为25 mmol/L硼酸-硼砂缓冲液；虾精氨酸激酶的最佳分离条件为分离电压18 kV，运行缓冲液为25 mmol/L硼酸-硼砂缓冲液。

7.4 测定

本方法采用外标校准曲线法定量测定。以系列致敏蛋白标准溶液浓度为横坐标，毛细管电泳峰面积为纵坐标，作标准曲线线性回归方程（如附录A），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。

8 结果计算

致敏性蛋白含量按式（1）计算：

………………………………………（1）

式中：

*M*\_i——致敏蛋白的含量（mg/g）；

*C*\_i——样品液中致敏蛋白含量（μg/mL）；

*V*——样品液体积（mL）；

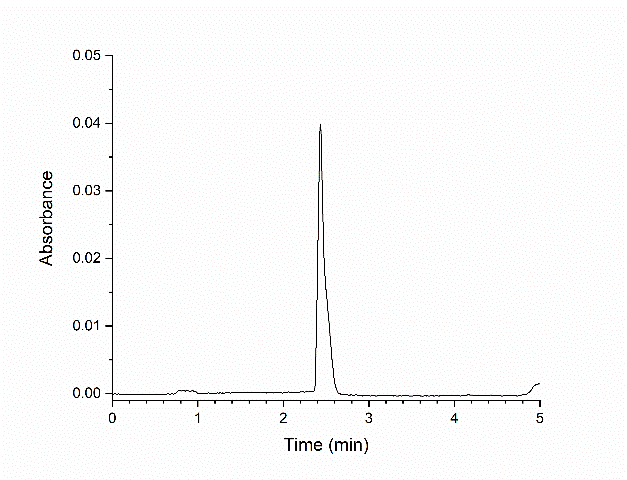
*m*——样品质量（g）。

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**

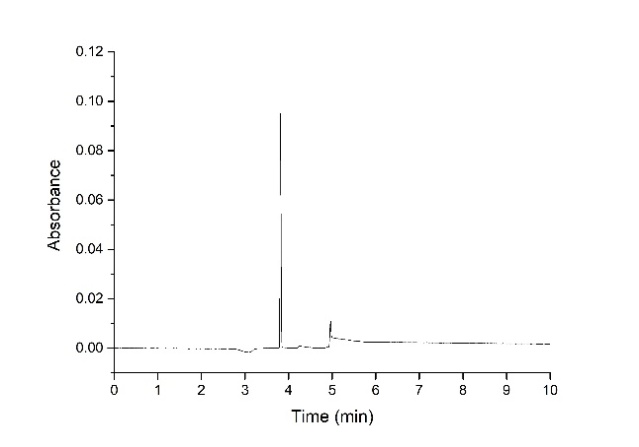
**（资料性附录）**

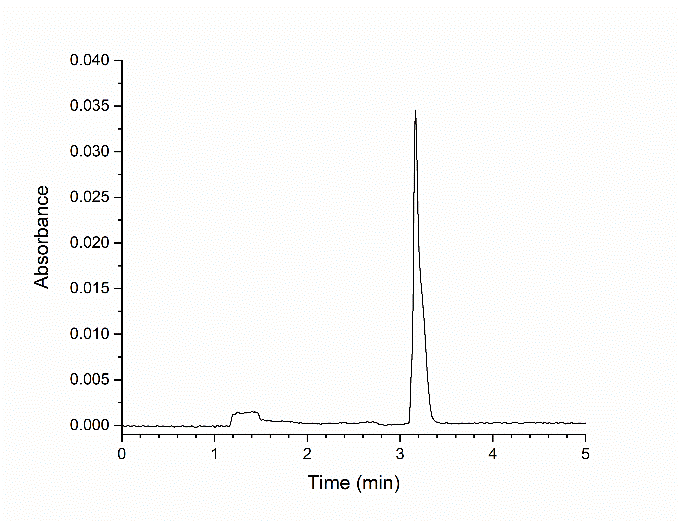
**标准溶液毛细管电泳图**

A.1 原肌球蛋白毛细管电泳图

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



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

A.3　小清蛋白毛细管电泳图

\_\_\_\_\_\_\_\_\_\_\_\_\_\_\_\_\_\_\_\_\_\_\_\_\_\_\_\_\_\_\_\_\_