

毛细管区带电泳进行乳品中乳铁蛋白的含量测定

The Determination of Lactoferrin in Dairy by Capillary Zone Electrophoresis

高铁¹, 陈泓序¹, 杨爱君², 何瑛², 纪坤发²

Gao Tie¹, Chen Hongxu¹, Yang Aijun², He Ying², Ji Kunfa²

¹ SCIEX, 中国; ² 燕塘乳业

¹ SCIEX, China; ² Yantang Milk

Keywords: Lactoferrin; P/ACE™ MDQ Plus Capillary Electrophoresis System; Capillary Zone Electrophoresis; Milk

1. 前言

乳铁蛋白 (Lactoferrin, Lf) 又称乳转铁蛋白, 是一种多功能生物活性铁结合糖蛋白, 属于转铁蛋白家族的一员, 具有多种生理功能, 如抗菌、抗病毒、免疫调节和抗氧化等。乳制品中其活性乳铁蛋白含量的多少可间接反映产品的价值。

对乳铁蛋白进行准确定量有助于评价乳制品的质量, 也可以反映乳制品加工过程中的生产工艺。由于乳铁蛋白在液态奶或奶粉等乳制品中含量较少, 可利用肝素亲和柱进行乳铁蛋白的富集并去除乳制品中其它蛋白和基质, 再利用蛋白超滤膜进行超滤浓缩; 富集后的样品可经毛细管电泳进行检测和定量。相比于其它分离分析工具, 毛细管电泳法具有操作简便、分离效率高、分离模式多、无毒无害等优势。

本文利用毛细管区带电泳检测乳品中的乳铁蛋白, 通过肝素柱纯化、富集和超滤管超滤浓缩富集, 可准确测定乳制品中的乳铁蛋白并进行定量。该方法适用于乳铁含量较低的生乳、液态奶、奶粉或配方奶粉等多种类型的乳品中乳铁蛋白的高灵敏度检测。

2. 试剂和方法

2.1. 试剂和样品

CEofix™ NTMP试剂盒 (Analisis, PN 10004780/A71142) 包含 pH



图1. P/ACE™ MDQ Plus毛细管电泳系统

7.0 缓冲液、pH 4.2 缓冲液、启动冲洗液和样品稀释液; 乳铁蛋白标准品 (Sigma-Aldrich, PN L4765); 氢氧化钠 (Sigma-Aldrich, PN S5881); 磷酸二氢钠 (MP Biomedicals, PN A0571); 磷酸氢二钠 (MP Biomedicals, PN A0404); 氯化钠 (MP Biomedicals, PN A0241); 肝素亲和柱 (美正, QC0140, 保质期18个月); 二次去离子水 (Millipore); 巴氏杀菌奶由燕塘乳业提供。

2.2. 仪器及方法

P/ACE™ MDQ Plus毛细管电泳系统, 匹配紫外检测器 (UV)。熔融石英毛细管: 50/60.2 cm (有效/总长度), 50µm内径; 分离条件: 15 kV, 30 min; 进样条件: 0.5 psi, 12 s; 毛细管温度: 25 °C; 样品室温度: 15 °C; UV检测器波长: 200 nm; 分离缓冲液选择pH 7.0缓冲液 (NTMP试剂盒)。图2为毛细管活化和分离的初始条件, 图3为毛细管活化和分离的检测器条件。

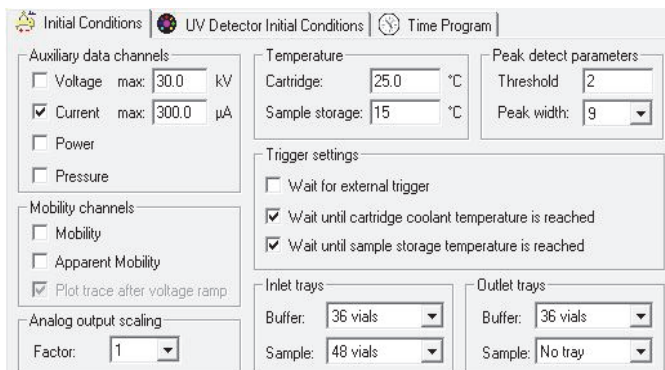


图2. 初始条件

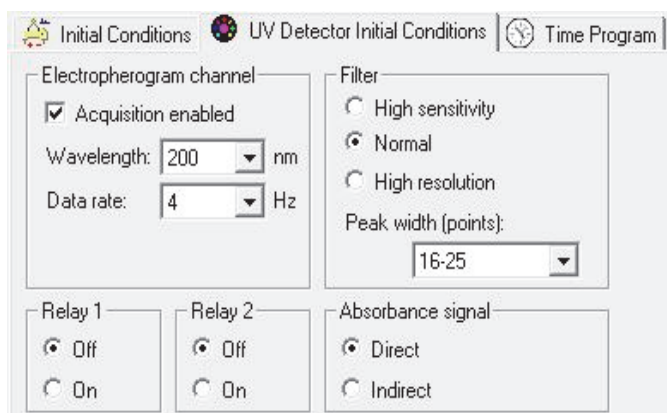


图3. 检测器条件

新毛细管活化：分别使用0.1 mol/L氢氧化钠溶液、启动冲洗液和pH 7.0缓冲液进行毛细管的冲洗活化。图4为毛细管活化的时间程序。

每针运行间毛细管的冲洗：启动冲洗液50 psi压力下冲洗0.5 min，pH 7.0缓冲液50 psi压力下冲洗1 min。图5为毛细管电泳分离的时间程序。

2.3. 标准品前处理

分别精确称取乳铁蛋白标准品3000 µg，添加2 mL二次去离子水，分别配置成1500 µg/mL标准品溶液；逐级稀释至如表1浓度。

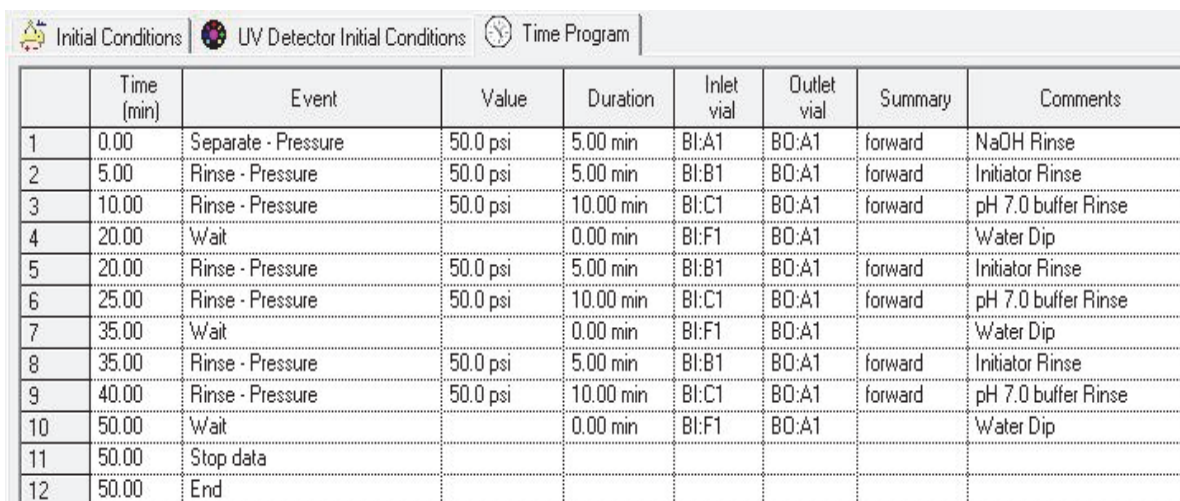
表1. 乳铁蛋白标准品逐级稀释后的浓度

稀释倍数	0	2	4	8	16	32
乳铁蛋白 (µg/mL)	1500	750	375	187	93	46

2.4. 样品前处理方法

使用肝素亲和柱需要配置的试剂：

- 1) 结合缓冲液 (100 mM, pH 7.5, NaH₂PO₄-Na₂HPO₄)：称取5.96 g 磷酸氢二钠和0.96 g 磷酸二氢钠，加入400 mL二次去离子水，充分溶解后定容至500 mL；
- 2) 淋洗液 (含 0.1 M NaCl 的 50 mM, pH 7.5, NaH₂PO₄-Na₂HPO₄)：称取 2.98 g 磷酸氢二钠、0.48 g 磷酸二氢钠和 2.92 g 氯化钠，加入 400 mL二次去离子水，充分溶解后定容至500mL；



	Time (min)	Event	Value	Duration	Inlet vial	Outlet vial	Summary	Comments
1	0.00	Separate - Pressure	50.0 psi	5.00 min	BI:A1	BO:A1	forward	NaOH Rinse
2	5.00	Rinse - Pressure	50.0 psi	5.00 min	BI:B1	BO:A1	forward	Initiator Rinse
3	10.00	Rinse - Pressure	50.0 psi	10.00 min	BI:C1	BO:A1	forward	pH 7.0 buffer Rinse
4	20.00	Wait		0.00 min	BI:F1	BO:A1		Water Dip
5	20.00	Rinse - Pressure	50.0 psi	5.00 min	BI:B1	BO:A1	forward	Initiator Rinse
6	25.00	Rinse - Pressure	50.0 psi	10.00 min	BI:C1	BO:A1	forward	pH 7.0 buffer Rinse
7	35.00	Wait		0.00 min	BI:F1	BO:A1		Water Dip
8	35.00	Rinse - Pressure	50.0 psi	5.00 min	BI:B1	BO:A1	forward	Initiator Rinse
9	40.00	Rinse - Pressure	50.0 psi	10.00 min	BI:C1	BO:A1	forward	pH 7.0 buffer Rinse
10	50.00	Wait		0.00 min	BI:F1	BO:A1		Water Dip
11	50.00	Stop data						
12	50.00	End						

图4. 毛细管活化的时间程序

Initial Conditions		UV Detector Initial Conditions		Time Program				
	Time (min)	Event	Value	Duration	Inlet vial	Outlet vial	Summary	Comments
1		Rinse - Pressure	50.0 psi	0.50 min	BI:B1	BO:A1	forward	Initiator Rinse
2		Rinse - Pressure	50.0 psi	1.00 min	BI:C1	BO:A1	forward	pH 7.0 buffer Rinse
3		Inject - Pressure	0.5 psi	12.0 sec	SI:A1	BO:C1	Override, forward	Sample Inject
4		Inject - Pressure	0.5 psi	8.0 sec	BI:D1	BO:B1	No override, forward	Sample buffer Inject
5	0.00	Separate - Voltage	15.0 KV	40.00 min	BI:E1	BO:B1	1.00 Min ramp, normal polarity	Separation
6	2.00	Autozero						
7	40.00	Stop data						
8	40.00	Rinse - Pressure	50.0 psi	1.00 min	BI:A1	BO:A1	forward	NaOH Rinse
9	41.00	End						

图5. 毛细管电泳分离的时间程序

3) 洗脱液 (含 1 M NaCl 的 50 mM, pH 7.5, NaH₂PO₄-Na₂HPO₄) : 称取 2.98 g 磷酸氢二钠、0.48 g 磷酸二氢钠和 29.2 g 氯化钠, 加入 400 mL 二次去离子水, 充分溶解后定容至 500 mL。

乳铁蛋白的纯化:

- 1) 肝素亲和柱去掉下方堵头, 利用注射器加压排出柱内保存液, 待保存液与筛板平齐后, 添加 5 mL 结合缓冲液进行冲洗;
- 2) 待结合缓冲液与筛板平齐后, 吸取 10 mL 巴氏杀菌奶, 添加 40 mL 结合缓冲液, 充分混合后逐次添加至肝素亲和柱中 (依靠重力进行乳铁蛋白与肝素亲和柱的结合);
- 3) 待样品液与筛板平齐后, 添加 15 mL 淋洗液, 将其余乳品中的杂质进行洗脱, 洗杂后利用注射器排干肝素亲和柱内液体;
- 4) 向肝素亲和柱添加 3.5 mL 洗脱液, 并进行富集 (依靠重力洗脱乳铁蛋白), 洗脱完后将富集液定容至 3.5 mL;
- 5) 将富集液利用 10 kDa 超滤管浓缩 10 倍, 作为最终进样的样品。

3. 结果

3.1. 外标曲线的制作

利用毛细管电泳分别检测不同级别浓度乳铁蛋白标准品, 以浓度为横坐标, 以校正峰面积为纵坐标进行外标曲线的制作。图6为乳铁蛋白不同浓度下的电泳图谱, 线性方程为 $y=7.55 \times 10^4 x + 635.56$, 线性相关性 $r^2=0.999$ 。

3.2. 乳品中乳铁蛋白的含量测定

巴氏杀菌奶经肝素亲和柱进行乳铁蛋白的纯化与富集, 并使用 10 kDa 超滤管超滤浓缩 10 倍进行检测, 如图7。利用外标曲线方程测定乳铁蛋白的含量, 检测浓度为 1181 $\mu\text{g/mL}$, 根据公式1计算可得实际浓度为 41 $\mu\text{g/mL}$ 。

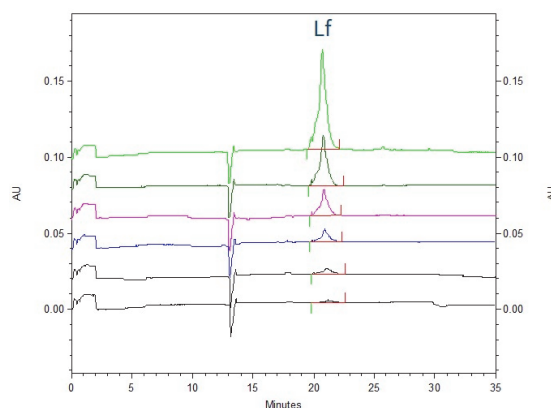


图6. 不同浓度下 (46-1500 $\mu\text{g/mL}$) 乳铁蛋白标准品的电泳图谱

$$\text{公式1: } y = \frac{\text{富集液体积} \times x}{\text{浓缩倍数} \times \text{初始体积}}$$

其中 y 为样品实际乳铁蛋白浓度, x 为检测浓度, 富集液体积为 3.5 mL, 10 kDa 超滤管超滤浓缩倍数为 10, 初始体积为 10 mL。

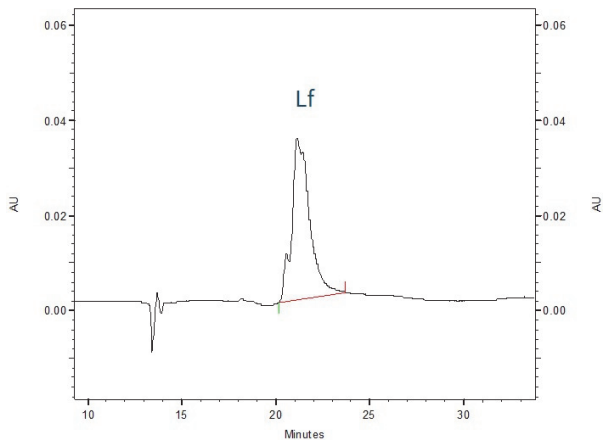


图7. 巴氏杀菌乳中乳铁蛋白的电泳图

4. 结论

本文使用毛细管区带电泳法对巴氏杀菌奶中的乳铁蛋白进行了定量分析。由于乳制品中乳铁蛋白含量较低，在样品前处理过程中可使用肝素亲和柱进行纯化和富集，再利用10 kDa超滤管进行超滤浓缩，处理后的样品可经毛细管区带电泳进行定量分析。根据外标曲线，本文测定了巴氏杀菌奶中的乳铁蛋白，其含量为41 $\mu\text{g/mL}$ 。该样品前处理及毛细管区带电泳测定乳铁蛋白含量的方法不仅适用于巴氏杀菌奶，同样适用于生乳、超高温灭菌奶、奶粉或配方奶粉等乳制品。

SCIEX临床诊断产品线仅用于体外诊断。仅凭处方销售。这些产品并非在所有国家地区都提供销售。获取有关具体可用信息，请联系当地销售代表或查阅<https://sciex.com.cn/diagnostics>。所有其他产品仅用于研究。不用于临床诊断。本文提及的商标和/或注册商标，也包括相关的标识、标志的所有权，归属于AB Sciex Pte. Ltd. 或在美国和/或某些其他国家地区的各权利所有人。© 2020 DH Tech. Dev. Pte. Ltd.

RUO-MKT-02-12224-ZH-A



SCIEX中国

北京分公司
北京市朝阳区酒仙桥中路24号院
1号楼5层
电话：010-5808-1388
传真：010-5808-1390
全国咨询电话：800-820-3488, 400-821-3897

上海公司及中国区应用支持中心
上海市长宁区福泉北路518号
1座502室
电话：021-2419-7200
传真：021-2419-7333
官网：sciex.com.cn

广州分公司
广州市天河区珠江西路15号
珠江城1907室
电话：020-8510-0200
传真：020-3876-0835
官方微信：[ABSciex-China](https://www.absciex.com.cn)