

牛乳中 A2 型 β -酪蛋白（A2 奶）鉴别技术 规程

Code of practice for identification of A2 type of β -casein(A2 milk) in cow's milk

地方标准信息服务平台

2023 - 04 - 07 发布

2023 - 05 - 07 实施

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。

本文件由天津市农业农村委员会提出并归口。

本文件起草单位：天津市农业科学院。

本文件主要起草人：马毅、谭冬飞、陈丽丽、赵康、张漫、芦娜、王丽学。

地方标准信息服务平台

牛乳中 A2 型 β -酪蛋白（A2 奶）鉴别技术规程

1 范围

本文件规定了牛奶中A2型 β -酪蛋白（A2奶）的检测原理、主要试剂配制、主要仪器设备、质谱检测及数据处理参数、检测方法、结果判定、废弃物的处理和检测过程中防止交叉污染的措施。

本文件适用于牛奶和奶粉中A2型 β -酪蛋白（A2奶）的检测。

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/T 6682 分析实验室用水规格和实验方法

GB/T 19495.2 转基因产品检测实验室技术要求

3 术语和定义

下列术语和定义适用于本文件。

3.1

A2 型 β -酪蛋白 A2 β -casein; A2 CSN2

β -酪蛋白由209个氨基酸组成，其一级序列中的第67位氨基酸的种类为脯氨酸（Proline, P）时，称为A2型 β -酪蛋白。

3.2

A2 奶 A2 milk

所含 β -酪蛋白为A2型的牛奶。

3.3

质荷比 mass-to-charge ratio

离子的质量 m 与其所带的电荷数 z 之比，以 m/z 表示。

4 检测原理

β -酪蛋白变体型对应的氨基酸突变位点为第67位组氨酸（Histidine, H）突变为脯氨酸（Proline, P），不同氨基酸之间存在分子量差异。利用质谱分析技术，根据差异肽段的分子量及质荷比差异将样品蛋白质中存在氨基酸突变的肽段鉴定出来，从而确定氨基酸突变位点，实现对不同突变体型 β -酪蛋白检测的目的。

5 试剂配制

实验所用水为符合GB/T 6682规定的一级水；高压灭菌条件为121℃， 1.034×10^5 Pa压力，蒸汽灭菌20min。试剂配制如下：

- 样品裂解液：将 480.4 g 尿素，7.1 g HEPES 溶于 800 mL 蒸馏水中，充分溶解后，定容至 1 L；
- 10% SDS（十二烷基硫酸钠）：将 10 g SDS 粉末溶于 80 mL 蒸馏水中，加热至 68℃助溶，用 HCl 调 pH 至 7.2，定容至 1000 mL，0.2 μm 的滤膜过滤，高压灭菌；
- 30%丙烯酰胺：将 29 g 丙烯酰胺和 1 g N,N'-亚甲双丙烯酰胺溶于总体积为 60 mL 的蒸馏水中，充分溶解后，定容至 100 mL；
- 1.5mol/L Tris-HCl (pH=8.8)：将 181.65 g Tris 溶于 800 mL 水中，加浓盐酸调 pH 至 8.8，容至 1000 mL；
- 1mol/L Tris-HCl (pH=6.8)：将 121.1 g Tris 溶于 800 mL 水中，加浓盐酸调 pH 至 6.8，容至 1000 mL；
- 10%过硫酸铵：将 10 g 过硫酸铵粉末溶于 80 mL 蒸馏水中，充分溶解后，定容至 100 mL；
- 考马斯亮蓝染色液：量取甲醇 45 mL，蒸馏水 45 mL，冰乙酸 10 mL，加入 0.25 g 考马斯亮蓝 R-250；
- 考染脱色液：50 mL 碳酸氢铵/乙腈=1: 1；
- 1 μg/μL 胰蛋白酶：将 100 μg 胰蛋白酶溶解到 100 μL 50 mmol/L 乙酸中，-70℃储存；
- 25mmol/L 碳酸氢铵：将 2.0 碳酸氢铵溶于 800 mL 蒸馏水中，充分溶解后，定容至 1 L。

6 仪器设备

6.1 单道可调移液器

0.25~2.5μl、1~10μl、2~20μl、5~50μl、10~100μl、20~200μl、100~1000μl。

6.2 10K 超滤管

超滤管截留蛋白分子量：30~90 KDa。

6.3 离心机

最高转速12 000 r/min，最大容量24×1.5 mL。

6.4 电子天平

万分之一精度。

6.5 凝胶成像分析系统

有胶像素1280×1024，检测灵敏度DNA≥0.05 ng。

6.6 稳压稳流电泳仪

输出电压0~600 V，输出电流0~100 mA。

6.7 垂直电泳槽

外形尺寸15 cm×12 cm×13 cm，凝胶板面积10 cm×10 cm。

6.8 高压灭菌锅

使用温度范围45~135℃，最高使用压力0.255 Mpa。

6.9 自动双重纯水蒸馏器

功率3 000 W，出水量2 500 mL/h。

6.10 微波炉

功率700 W，容积2 0L。

6.11 冰箱

4 °C，-20 °C。

6.12 电热恒温水浴锅

RT+5~70 °C

7 质谱检测及数据处理参数

应按照附录A执行。

8 检测方法

8.1 样本采集

每头奶牛采集新鲜牛奶（排除头奶和末乳）50 mL，充分混匀后，-80 °C保存。

8.2 蛋白提取

8.2.1 从-80 °C取出牛奶样本，常温解冻后充分混匀，取样50 μL。

8.2.2 向上述样品中加入500 μL裂解液[8 mol/L尿素，30 mmol/L 4-羟乙基哌嗪乙磺酸（HEPES）]。冰上裂解10 min。4 °C，20 000g，离心30 min。取上清，避免吸到油脂。

8.2.3 加入二硫苏糖醇（DTT）至终浓度10 mmol/L。56 °C水浴1 h。取出后，迅速加入碘乙酰胺（IAM）至终浓度55 mmol/L，暗室静置1 h。

8.2.4 使用考马斯蓝染色法（Bradford法）对蛋白质进行定量。

8.2.5 对定量后的蛋白质进行十二烷基磺酸钠-聚丙烯酰胺凝胶电泳（SDS-PAGE）分析（如附录C.1）。

8.3 蛋白质的消化

8.3.1 取8.2.5中蛋白20 μg，加入到10 K超滤管中，14 000 g，4 °C，离心40 min，弃废液。

8.3.2 加入200 μL的25 mmol/L碳酸氢铵（ NH_4HCO_3 ），14 000 g，4 °C，离心40 min，弃废液。

8.3.3 重复8.3.2步骤两遍。

8.3.4 加入1 μg/μL的胰蛋白酶（Trypsin）和V8蛋白酶（Glu-C）各1 μL，37 °C水浴24 h。离心收集消化后的肽段。

8.3.5 真空抽干消化后的肽段。

8.3.6 0.1 %甲酸（FA）复溶肽段。

8.4 质谱鉴定

8.4.1 将8.3.5提取的酪蛋白肽段进行上机检测。使用高效液相色谱-四级杆-飞行时间质谱仪对获得的酪蛋白肽段进行分离并检测，液相及质谱检测参数见表1~表3。

表 1 液相色谱柱参数

项目	参数
色谱柱	Waters Xbridge BEH300 C18(100 mm×2.1 mm 3.5 μm)
流动相 A	0.2% 甲酸-水(v/v)
流动相 B	0.2% 甲酸乙腈(v/v)
柱温箱	40℃
流速	0.3 mL/min
进样体积	5 μL

表 2 液相色谱流动相洗脱梯度

时间(分)	B液比例
0	2%
2	2%
5	10%
20	40%
22	95%
25	95%
25.1	2%
28	2%

表 3 质谱检测-离子源参数

参数名称	参数值
离子模式	正离子模式
母离子扫描范围	50-2000 m/z
二级分辨率	30000
离子源温度	500
离子化电压	5500 V
采集模式	数据依赖型采集(Independent data acquired, IDA)
碰撞能量	35±15 V
气帘气	氮气 35 psi
雾化气	氮气 50psi
辅助加热气	氮气 50 psi

8.4.2 对原始数据进行过滤、峰提取和筛选，确定特征性肽段。质谱扫描完毕，得到质谱原始文件，将质谱原始数据文件导入后，进行一级色谱峰的滤噪、峰提取、筛选出含有 p. 67 位氨基酸的特征肽段，

筛选参数见表 4。

表 4 质谱峰筛选参数

参数名称	实验选项
母离子质量范围	50-2000 Da
质量偏差宽度	0.02 Da
保留时间偏差	0.2 min
信噪比 S/N 域值	3

8.4.3 筛选后的差异性肽段用 ProteinPilot 软件进行差异肽段序列的比对和鉴定，检索参数见表 5。

表 5 鉴定检索参数

参数名称	参数条件
烷基化试剂	碘乙酰胺
可变修饰	Oxidation (M), Gln→Pyro-Glu (N-term Q) Phospho (ST), Ser→Arg (S), Ser→Lys (S), Arg→Cys (R), Gln→Glu (Q), Glu→Lys (E), Met→Leu (M), Pro→His (P), Pro→Leu (P), His→Gln (H)
质量偏差	0.35 Da
最大允许漏切数	1
酶的类型 (Enzyme)	Trypsin
置信度 (FDR)	> 95 %
数据库 (Database)	https://www.uniprot.org/_Bos_taurus

9 结果判定

9.1 SDS-PAGE 鉴定

将从样品中提取的蛋白质进行 SDS-PAGE 分离鉴定，检测蛋白条带是否清晰无降解。条带清晰，表示可用于后续检测，否则重新取样鉴定，检测结果见图 1。

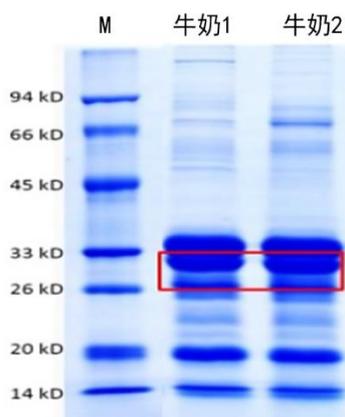


图1 SDS-PAGE 检测结果（红框内条带为 β -酪蛋白）

9.2 A2型 β -酪蛋白的判定

根据质谱鉴定结果，当待测样品的中 p.67 H 氨基酸突变为 p.67 P（如图 2），检测结果表述为“A2 奶”。

10	20	30	40	50
RELEELNVPG	EIVESLSSE	ESITRINKKI	EKFQSEEQQQ	TEDELQDKIH
60	70	80	90	100
PFAQTQSLVY	PFPGP ^H NSL	PQNIPPLTQT	PVVVPPFLQP	EVMGVSKVKE
110	120	130	140	150
AMAPKHKEMP	FPKYPVEPFT	ESQSLTLTDV	ENLHLPLPLL	QSWMHQPHQP
160	170	180	190	200
LPPTVMFPPQ	SVLSLSQSKV	LPVPQKAVPY	PQRDMPIQAF	LLYQEPVLGP
				VRGPFV
				IIV

注：虚线框内为不同变体型 β -酪蛋白的突变位点。

图2 A2型 β -酪蛋白对应的氨基酸序列

10 废弃物处理

应按照GB/T 19495.2的规定执行。

11 交叉污染防止措施

应按照GB/T 19495.2的规定执行。

附录 A
(规范性)
特征肽段质谱图

筛选并鉴定到的特征性肽段为LVYFPFGPIPN (59位到68位), 肽段中N端碎片离子为b离子模式, C端碎片离子为y离子模式, b₂代表肽段中N端前两个氨基酸组成的碎片离子, y₂代表肽段中C端两个氨基酸组成的碎片信息, a图代表A1奶β-酪蛋白含有特征肽段(LVYFPFGPIHN)的二级碎片离子图, b图代表A2奶β-酪蛋白含有特征肽段(LVYFPFGPIPN)的二级碎片离子图。

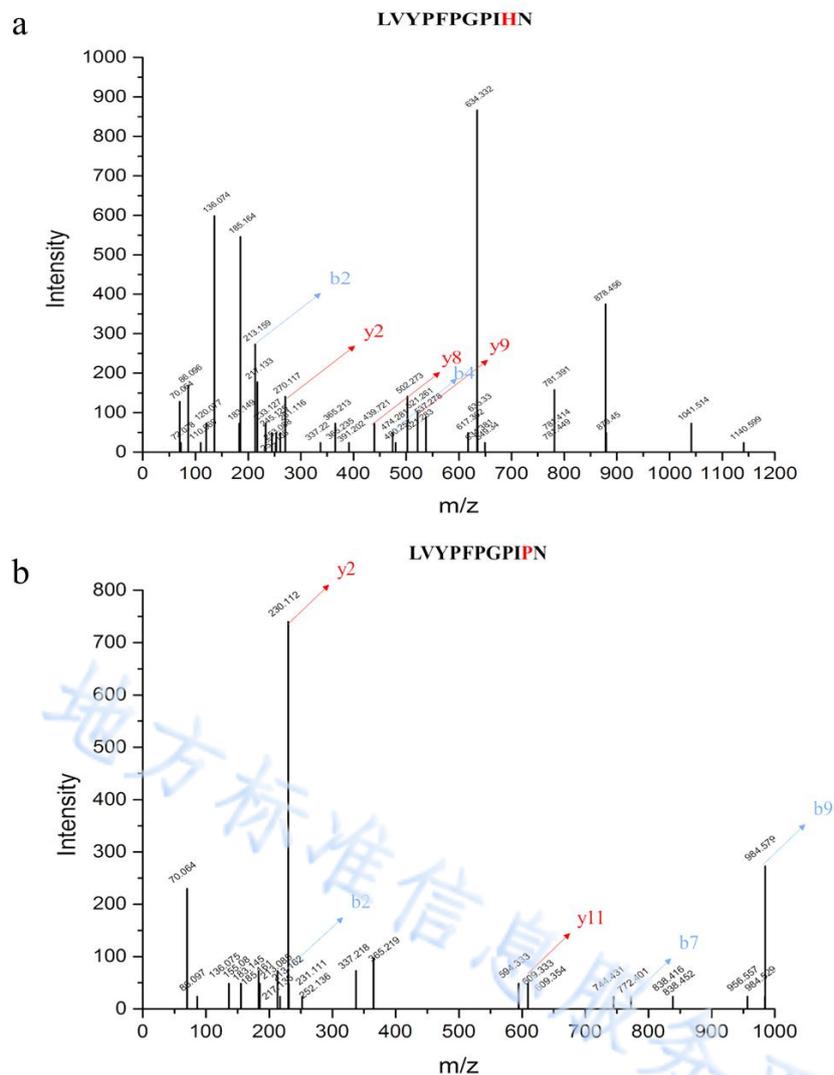


图 A.1 (a) A1 奶β-酪蛋白特征肽段(LVYFPFGPIHN)二级离子碎片信息 (b) A2 奶β-酪蛋白特征肽段(LVYFPFGPIPN)二级离子碎片信息