SN

中华人民共和国出入境检验检疫行业标准

SN/T 2545—2010

动物源性食品中热变性蛋白检测方法

Testing method of thermal denaturation protein in animal derived food

2010-03-02 发布　　2010-09-16 实施

中华人民共和国
国家质量监督检验检疫总局　发布

前　言

本标准由国家认证认可监督管理委员会提出并归口。

本标准起草单位：中华人民共和国山东出入境检验检疫局、中华人民共和国天津出入境检验检疫局。

本标准主要起草人：高宏伟、梁成珠、郑文杰、孙敏、贺艳。

本标准系首次发布的出入境检验检疫行业标准。

食品伙伴网http://www.foodmate.net

动物源性食品中热变性蛋白检测方法

1 范围

本标准规定了动物源性食品中热变性蛋白检测的SDS-聚丙烯酰胺电泳法和乳酸脱氢酶活性测定法。

本标准适用于检验动物来源的食品是否达到规定的加热温度和加热时间。

SDS-PAGE电泳检测方法适用于各种新鲜和加入烹饪调料的猪、牛、鸡、鸭、羊来源的肉类制品加热终点温度的检测。检测的加热温度在65 ℃～80 ℃。

乳酸脱氢酶活性测定方法适用于没有加入调味料和没有腌制过的猪、牛、鸭、羊来源的肉类制品在加热终点温度的检测。检测的加热温度在65 ℃～80 ℃。

2 规范性引用文件

下列文件中的条款通过本标准的引用而成为本标准的条款。凡是注明日期的引用文件，其随后所有的修改单(不包括勘误内容)或修订版均不适用于本标准，然后，鼓励根据本标准达成协议的各方研究是否可使用这些文件的最新版本。凡是不注日期的引用文件，其最新版本适用于本标准。

GB/T 6682 分析实验室用水规格和试验方法

3 术语、定义和缩略语

下列术语、定义和缩略语适用于本标准。

3.1 术语

3.1.1

动物源性食品 animal derived food

猪、牛、鸡、鸭、羊来源的肉制品。

3.1.2

SDS-聚丙烯酰胺凝胶电泳 sodium dodecylsulfate-polyacrylamide gel electrophoresis

在SDS聚丙烯酰胺凝胶电泳，大多数蛋白都能与阳离子表面活性剂十二烷基硫酸钠(SDS)按质量比结合成复合物，使蛋白分子所带的负电荷远远超过天然蛋白分子的负电荷，消除了不同蛋白分子的电荷效应，使蛋白分子相对迁移率(R″<[m]>)的大小完全取决于分子量的高低。

3.1.3

热变性蛋白 thermal denaturation protein

蛋白质中有一部分是热稳定蛋白，另外一部分是热不稳定蛋白。热不稳定蛋白在经过一定温度和时间的加热后就改变其蛋白质的结构，或者分解成分子量小的多肽，这部分蛋白质称为热变性蛋白。

3.2 缩略语

3.2.1 **SDS-PAGE Sodium dodecylsulfate-polyacrylamide gel electrophoresis**

十二烷基硫酸钠-聚丙烯酰胺凝胶电泳。

3.2.2 **SDS Sodium dodecylsulfate**

十二烷基硫酸钠，阳离子表面活性剂。

3.2.3 **Tris tris(hydroxymethyl)aminomethane**

三(羟甲基)氨基甲烷。

食品伙伴网http://www.foodmate.net

3.2.4 **TEMED** ***N*,*N*,*N*,*N*-Tetramethyl-Ethylenediamine**

四甲基乙二胺。

3.2.5 **LDH** **Lactic dehydrogenase**

乳酸脱氢酶。

4 原理

4.1 SDS-PAGE 电泳检测方法

当蛋白质受到热或受到其他物理及化学作用时，其特有的结构会发生变化，使其性质也随之发生改变，如溶解度降低，对酶水解的敏感度提高，失去生理活性等，这种现象称为变性作用。变性并不是蛋白质发生分解，而仅仅是蛋白质的二、三、四级结构发生变化。动物蛋白加热后热不稳定蛋百高级结构变化并且在相对分子质量上体现出来。只有部分热稳定蛋白在加热前后的相对分子质量不变。SDS-聚丙烯酰胺凝胶电泳，蛋白质分子的迁移速度取决于分子大小。动物源的肉食品中经过一定温度和时间加热后，提取蛋白质并进行 SDS-PAGE 电泳，其条带在一定的分子量区间内与没有满足加热的样品中提取的蛋白质的图谱有明显不同，不同表现在条带的多少和浓度上。

4.2 乳酸脱氢酶活性测定方法

禽畜肉中的乳酸脱氢酶随着加热温度的升高而降低，在一定温度范围内两者成线形关系，从而检测乳酸脱氢酶活性可以推算出禽畜肉是否达到相应加热温度。乳酸脱氢酶活性测定的原理为乳酸和氧化型辅酶在乳酸脱氢酶的催化下生成还原型辅酶和丙酮酸，丙酮酸与 2,4-二硝基苯肼反应生成丙酮酸二硝基苯腙。反应中，乳酸脱氢酶催化乳酸生成丙酮酸，然后丙酮酸与试剂中的 2,4-二硝基苯肼反应生成丙酮酸二硝基苯腙。丙酮酸二硝基苯腙在碱性溶液中呈棕红色，其颜色深浅与丙酮酸浓度呈正比。由于禽畜肉中的乳酸脱氢酶在高温下被失活，因此通过检测丙酮酸二硝基苯腙即可检测乳酸脱氢酶的含量或活性，并与已被加热到规定温度的禽畜肉的标准酶活值进行比较，最终可判断样品是否达到适当的加热温度。

5 试剂

除另有规定外，所使用的试剂为分析纯或生化纯试剂，水为按照 GB/T 6682 规定的一级水。

5.1 中等相对分子质量蛋白质标准的组成：Rabbit phosphorylase B 97 400 Dalton、Bovine Serum Albumin 66 200 Dalton、Ovalbumin 42 700 Dalton、Carbonic Anhydrase 31 000 Dalton、Trypsin Inhibitor 20 100 Dalton、Lysozyme 14 400 Dalton）开封后溶于 200 μL 的双蒸水，分装于 20 个小管内（每管 10 μL），于沸水中加热 5 min 后，保存于－20 ℃。使用前于室温融化，加 DTT 至 100 mmol/L，于沸水中加热 5 min 后上样。如果用银染检测蛋白，应用 1×的上样缓冲液（50 mmol/L Tris-HCl，pH6.8，10%甘油，2%SDS，0.05%溴酚蓝，100 mmol/L DTT）稀释 50 倍后再上样。

5.2 A 液 100 mL：29.2 g 丙烯酰胺，0.8 g*N*,*N*-甲叉双丙烯酰胺，加去离子水定容至 100 mL。

5.3 B 液 100 mL：75 mL 2 mol/L Tris-HCl（pH8.8），4 mL 10% SDS，21 mL 加去离子水。

5.4 C 液 100 mL：50 mL 1 mol/L Tris-HCl（pH6.8），4 mL 10% SDS，46 mL 加去离子水。

5.5 5 倍样品缓冲液：0.6 mL 1 mol/L Tris-HCl（pH＝6.8），5 mL 50%甘油。2 mL 10% SDS. 0.5 mL 2-巯基乙醇，1 mL 1%溴酚蓝，0.9 mL 去离子水。

5.6 10% SDS（十二烷基磺酸钠）。

5.7 10%过硫酸铵（AP）。

5.8 TEMED（四甲基乙二胺）。

5.9 染色固定液：取 50%甲醇 454 mL，冰乙酸 46 mL 混匀。

5.10 染色液：称取考马斯亮蓝 R250 0.125 g，加上述固定液 250 mL，过滤后备用。

5.11 脱色液：冰乙酸 75 mL，甲醇 50 mL，加蒸馏水定容至 1 000 mL。

食品伙伴网http://www.foodmate.net

5.12 电泳缓冲液(内含 0.1% SDS,0.05 mol/L Tris-0.384 mol/L 甘氨酸缓冲液 pH8.3):称 Tris 6.0 g,甘氨酸 28.8 g,加入 SDS 1 g,加蒸馏水使其溶解后定容至 1 000 mL,pH8.3。

5.13 10 mL 离心管和 1.5 mL。

5.14 0.5 mol/L Tris-HCl 缓冲液:称取 60.6 g Tris Base,加蒸馏水定容至 1 000 mL,用 HCl 调节至 pH 6.8。

5.15 底物缓冲液:0.3 mol/L 乳酸锂。二乙醇胺 2.1 g,乳酸锂 2.9 g,调 pH 值至 8.8,用水定容至 100 mL。

5.16 11.3 mol/L NAD 溶液:NAD 15 mg,用水定容至 2 mL,4 ℃保存至少可用 2 周。

5.17 1 mmol/L 2,4-二硝基苯肼溶液:2,4-二硝基苯肼 198 mg,加 10 mol/L HCl 100 mL,待溶解后加蒸馏水定容至 1 000 mL,置棕色玻璃瓶中保存。

5.18 0.4 mmol/L 氢氧化钠溶液:氢氧化钠 1.6 g 定容至 100 mL。

5.19 0.5 mmol/L 丙酮酸标准液:丙酮酸钠 11 mg,以底物缓冲液溶解后定容至 200 mL 容量瓶,临用前配制。

5.20 LDH 标准品。

6 仪器设备

6.1 垂直电泳系统。

6.2 水浴锅。

6.3 离心机。

6.4 笔式温度传感器。

6.5 高速匀浆机。

6.6 水浴锅。

6.7 脱色摇床。

6.8 组织粉碎机。

6.9 天平(精确到 0.001 g)。

6.10 均质器。

6.11 离心机。

6.12 水浴锅。

6.13 探针式温度计。

6.14 酶标仪。

6.15 温育培养箱(5 ℃～60 ℃)。

6.16 单道微量加样器:50 μL,100 μL,20 μL～200 μL 可调,200 μL～1 000 μL 可调。

6.17 多通道微量加样器:50 μL～250 μL 可调。

7 检测方法

7.1 SDS-PAGE 电泳检测方法

7.1.1 制样

称取样品的肌肉或内脏的内部组织 10 g,分两份。每份 5 g,其中一份室温放置,命名样品 C(control);一份在恒温水浴加热,如果报检样品有加热温度和加热时间的检测要求则按照样品报检要求检测,如果报检样品只要求检测样品是否热变性,则按照热加工温度 75 ℃ 1 min 的要求来检测。样品中心放置温度计,待样品中心温度达到报检温度时开始计时,再加热报检规定的加热时间,命名为 H(heat)。样品 C、样品 H 各加入 4 ℃预冷的 0.5 mol/L Tris-HCl 缓冲液 20 mL。匀浆 10 s,8 000 r/min 离心 20 min。各取 100 μL 上清液放入 4 ℃等待上样。

食品伙伴网http://www.foodmate.net

7.1.2 SDS-PAGE 电泳

7.1.2.1 配制聚丙烯酰胺凝胶

配制分离胶浓度为10%，厚度为1.5 mm，配制10 mL，需A液3.3 mL，B液2.5 mL，去离子水4.8 mL，10%过硫酸铵100 μL，TEMED 10 μL。按照电泳槽说明书组装凝胶模具，用吸管吸取分离胶溶液，沿隔板缓慢加入模具内，小心避免产生气泡，当加入的溶液至前玻璃板1.5 mL时即可，轻轻在分离胶溶液上覆盖一层1 mm～5 mm的水层，这使凝胶表面变得平整。等待30 min～60 min，使凝胶聚合。

配制浓缩胶浓度为5%，配制4 mL，需A液0.67 mL，C液1.0 mL，去离子水2.3 mL，10%过硫酸铵30 μL，TEMED 5 μL。轻轻吸去水层，用吸管吸取堆积胶溶液缓慢加入，直至凝胶溶液到达前玻璃板的顶端，插入梳子，约30 min凝胶聚合，小心拔出梳子，将凝胶放入电泳槽内，预先接好电极，将电泳缓冲液加入内外电泳槽中，使凝胶的上下端均能浸泡在缓冲液中。

注：也可以使用相同浓度的聚丙烯酰胺预制胶产品。

7.1.2.2 制备样品和上样

取20 μL样品与5 μL 5×样品缓冲液在一个Eppendorf管中混合，离心10 s，用微量注射器吸取样品20 μL加入样品孔底部。

7.1.2.3 电泳

打开电泳仪，将电压调至200 V，恒压大约30 min，当溴酚蓝达到凝胶底部，关闭电源。

7.1.2.4 染色

戴手套将凝胶放入盛有100 mL染色固定液的容器中，在摇床上振荡30 min，加入考马斯亮蓝染液200 mL染色1 h。弃去染液，将凝胶在水中漂洗3次，加入脱色液100 mL，振荡1 h后观察结果，并照相。也可以使用购买商品化的具有相同效果的染色剂和脱色剂，并按照其说明书操作。

7.2 乳酸脱氢酶活性测定方法

7.2.1 制样

7.2.1.1 样品制备

切取对照样品的肌肉几何中心组织10 g，分两份。每份5 g，其中一份室温放置，命名该样品为C(control)；一份在恒温水浴加热，如果待验样品有加热温度和加热时间的检测要求则按具体要求检测，如果待验样品只要求检测样品是否热变性，则按照热加工温度75 ℃ 1 min的要求来检测，对照样品中心放置探针式温度计，待样品中心温度达到要求温度时开始计时，再加热到所要求的加热时间，命名该样品为H(heat)。

将样品C、样品H和待验样品切碎后，经组织粉碎机粉碎，混匀，装入洁净容器内，作为试样，密封，并标明标记。

7.2.1.2 样品保存

抽样后样品应立即在－18 ℃以下冷冻保存，0 ℃～5 ℃条件下48 h内送达实验室。在抽样和制样过程中，应防止样品受到温度变化的影响。

7.2.1.3 样品提取

称取5 g(精确到0.01 g)粗粉碎样品到50 mL离心管中，加入15 mL磷酸盐缓冲液，用均质器低速均质至糜状，均质过程中保持冰浴。4 000 r/min 4 ℃离心5 mi n，取上清液进行分析。

7.2.2 检测

7.2.2.1 标准曲线的绘制

按表1进行操作，室温放置5 min后，波长440 nm比色杯1.0 cm，用B管调零，读取各管吸光度，并与相应的酶活力单位绘制标准曲线。

食品伙伴网http://www.foodmate.net

表 1　标准曲线配置

加入物/mL	B	1	2	3	4	5
丙酮酸标准液	0	0.025	0.05	0.1	0.15	0.2
底物缓冲液	0.5	0.475	0.45	0.4	0.35	0.3
蒸馏水	0.11	0.11	0.11	0.11	0.11	0.11
2,4-二硝基苯肼溶液	0.5	0.5	0.5	0.5	0.5	0.5
37 ℃水浴 5 min						
0.4 mol/L 氢氧化钠溶液	5	5	5	5	5	5
相当的 LDH 单位	0	125	250	500	750	1 000

7.2.2.2　样品测定

按表 2 进行操作，室温放置 5 min 后，波长 440 nm 比色杯 1.0 cm，用蒸馏水调零，读取各管吸光度。

表 2　样品测定

加入物/mL	测定管	对照管
上清液	0.01	0.01
底物缓冲液	0.5	0.5
37 ℃水浴 5 min		
2,4-二硝基苯肼溶液	0.5	0.5
NAD 溶液	0.1	—
37 ℃水浴 5 min		
0.4 M 氢氧化钠溶液	5	5

7.2.2.3　结果的计算

绘制标准曲线，以吸光值为纵坐标，相当的 LDH 酶活单位为横坐标绘制标准曲线。每次试验均应重新绘制标准曲线，从标准曲线上读取待测样品中的酶活单位，并对样品 C(control)和样品 H(heat)的酶活进行 t 检验，以判断是否有显著差异。

8　结果判定

8.1　SDS-PAGE 电泳法结果判定

如果样品 C(control)和样品 H(heat)的电泳条带显示一致，说明送检样品已经达到要求的加热温度和加热时间。

如果样品 C(control)比样品 H(heat)的电泳条带多，说明送检样品没有达到要求的加热温度和加热时间。

如果样品 C(control)比样品 H(heat)的电泳条带少，说明样品 H 前处理没有达到要求的加热温度和时间，需要重新进行样品 H 前处理。

在已知样品要求样品加热温度和时间的条件下，检测合格样品为达到已知温度和时间；检测不合格样品为没有达到已知的温度和时间。

8.2　乳酸脱氢酶活性法结果判定

如果待验样品和样品 H(heat)的酶活无显著差异，说明该样品已经达到要求的加热温度和加热时间。

如果待验样品和样品 H(heat)的酶活有显著差异，说明该样品没有达到要求的加热温度和加热时间。

食品伙伴网http://www.foodmate.net

中华人民共和国出入境检验检疫
行 业 标 准
动物源性食品中热变性蛋白检测方法
SN/T 2545—2010
*
中 国 标 准 出 版 社 出 版
北京复兴门外三里河北街 16 号
邮政编码:100045
网址 www.spc.net.cn
电话:68523946 68517548
中国标准出版社秦皇岛印刷厂印刷
*
开本 880×1230 1/16 印张 0.75 字数 11 千字
2010 年 5 月第一版 2010 年 5 月第一次印刷
印数 1—1 600
*
书号:155066·2-20867 定价 16.00 元

SN/T 2545-2010

食品伙伴网http://www.foodmate.net