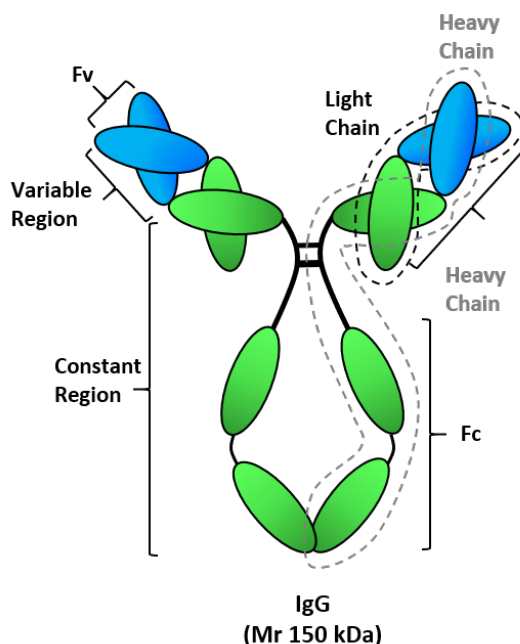


乳制品中免疫球蛋白 IgG 的提取与检测

背景

免疫球蛋白 (Immunoglobulin, Ig) 是具有抗体活性的动物蛋白, 可分为 IgG、IgA、IgM、IgD、IgE 五类。人体血清中免疫球蛋白的主要成分是 IgG, 它在人体内具有重要的免疫和生理调节功能, 是人体内免疫系统中最为关键的组成物质之一。



目前, 添加 IgG 的乳制品备受消费者的追捧, 因乳制品成份较为复杂, 若直接提取后使用液相色谱法进行测定, IgG 受杂蛋白干扰较大, 无法进行准确地定量和定性。参照 GB/T 5009.194-2003, 纳谱分析开发的整体解决方案, 包括样品的前处理、样品的固相萃取净化、液相检测方法, 使 IgG 实验操作简便高效、检测结果准确可靠。

“新鲜”创造未来

- 乳铁蛋白 $\geq 30\text{mg/L}$
功能: 免疫调节、抗菌、抗病毒、促进铁吸收
功能出处: 《乳清蛋白及其活性多肽的生物学功能研究进展》等
- 免疫球蛋白 $\geq 100\text{mg/L}$
功能: 提高摄入者的免疫力 (尤其是肠道局部的免疫力)
功能出处: 《牛乳中的免疫球蛋白与健康的研究》
- 乳过氧化物酶 $\geq 500\mu\text{g/L}$
功能: 抗菌、抗炎、抗病毒
功能出处: 《乳清蛋白及其活性多肽的生物学功能研究进展》

适用范围

参照 GB/T 5009.194-2003 保健食品中免疫球蛋白 IgG 的测定, 创新地引入了固相萃取方法, 优化了液相色谱方法。本方法适用于乳制品中免疫球蛋白 IgG 含量的测定。

实验步骤

1、试剂的准备

0.05 mol/L pH6.5 的 PBS 缓冲溶液：使用 Na_2HPO_4 和 NaH_2PO_4 进行配置；

冰乙酸溶液：准确吸取 3 mL 冰乙酸定容至 1 L 水中，再使用低浓度的 NaOH 溶液调节 pH 至 3.0。

2、样品的制备

巴氏杀毒奶：准确称取试样 2.0 g（精确至 0.001 g），用 0.05 mol/L pH6.5 的 PBS 缓冲溶液稀释至 25 mL，摇匀，通过 0.45 μm 微孔滤膜后备用。

乳粉：准确称取试样 0.1 g（精确至 0.001 g），用 0.05 mol/L pH6.5 的 PBS 缓冲溶液稀释至 25 mL，摇匀，通过 0.45 μm 微孔滤膜后备用。

3、固相萃取方法

活化：SelectCore Protein G 亲和柱，依次使用 5.0 mL 水、10.0 mL 0.05 mol/L pH6.5 的 PBS 缓冲溶液活化；

上样：取步骤 2 中制备好的巴氏杀毒奶溶液 10 mL 或乳粉 5.0 mL 上样至固相萃取柱上，弃去流出液；

淋洗：使用 5.0 mL 0.05 mol/L pH6.5 的磷酸盐缓冲溶液淋洗，弃去淋洗液；

洗脱：用 4 mL 冰乙酸溶液洗脱，收集全部洗脱液，并用冰乙酸溶液定容至 5.0 mL，混匀；

洗脱液直接使用高效液相色谱仪进行测定。

4、液相色谱仪器条件

Column: BioCore SEC-300, 5 μm

Dimension: 7.8×300 mm

Mobile Phase: 150 mmol/L 氯化钠溶于 20 mmol/L PBS 缓冲溶液中 (pH7.0)

Flow rate: 0.5 mL/min

Temperature: 30 °C

Injection: 10 μL

Detection: UV 214 nm

实验谱图

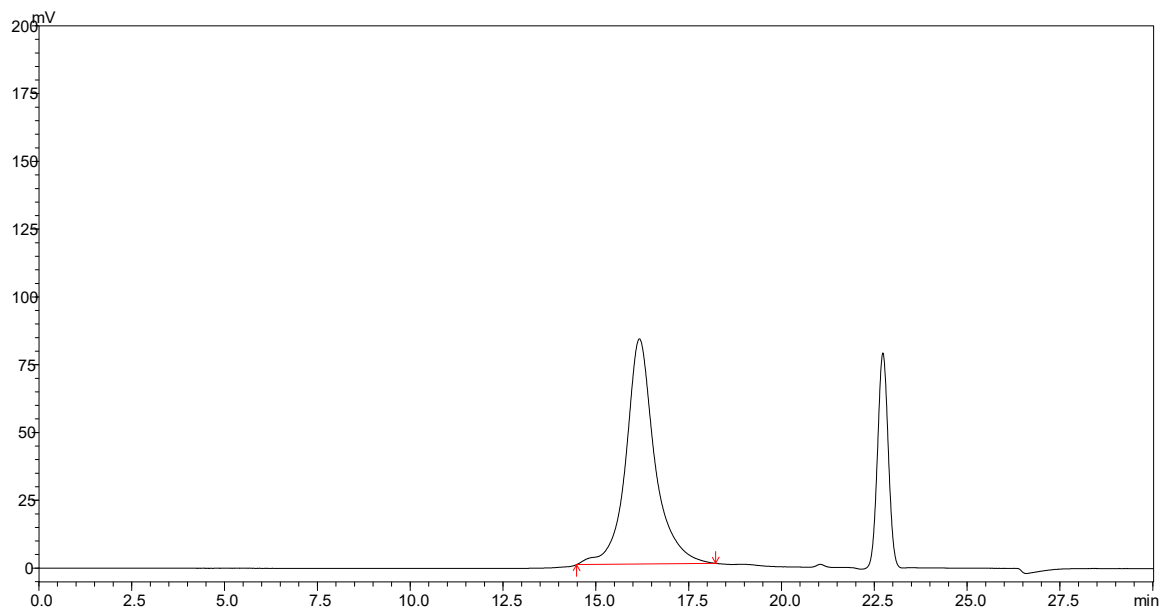


图 1: 200 µg/mL 免疫球蛋白 IgG 标准品色谱图

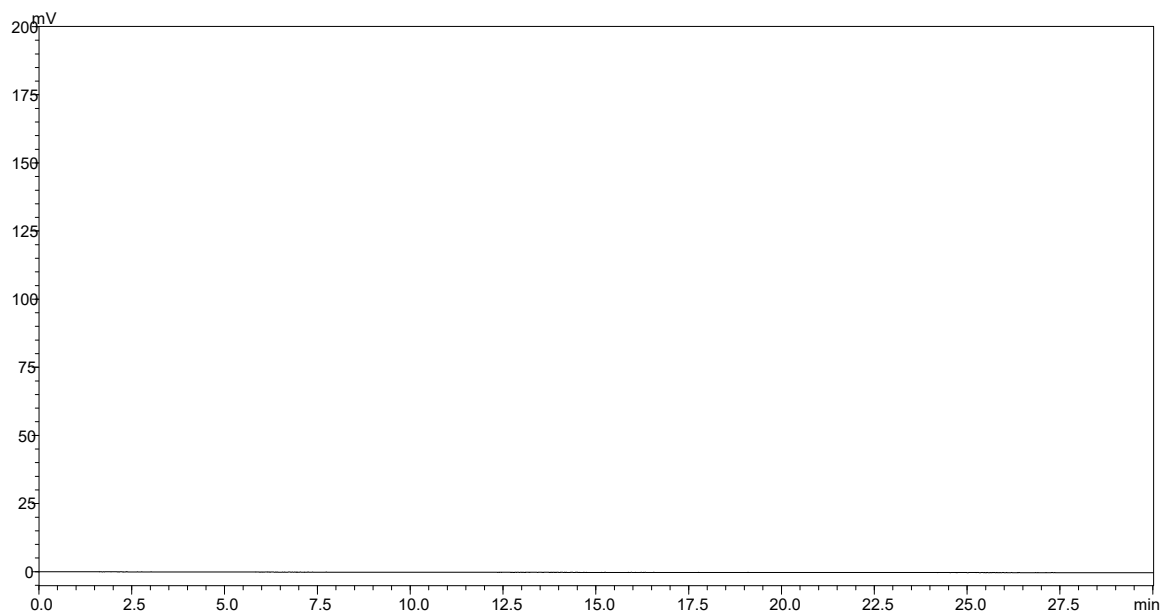


图 2: 色谱柱残留色谱图

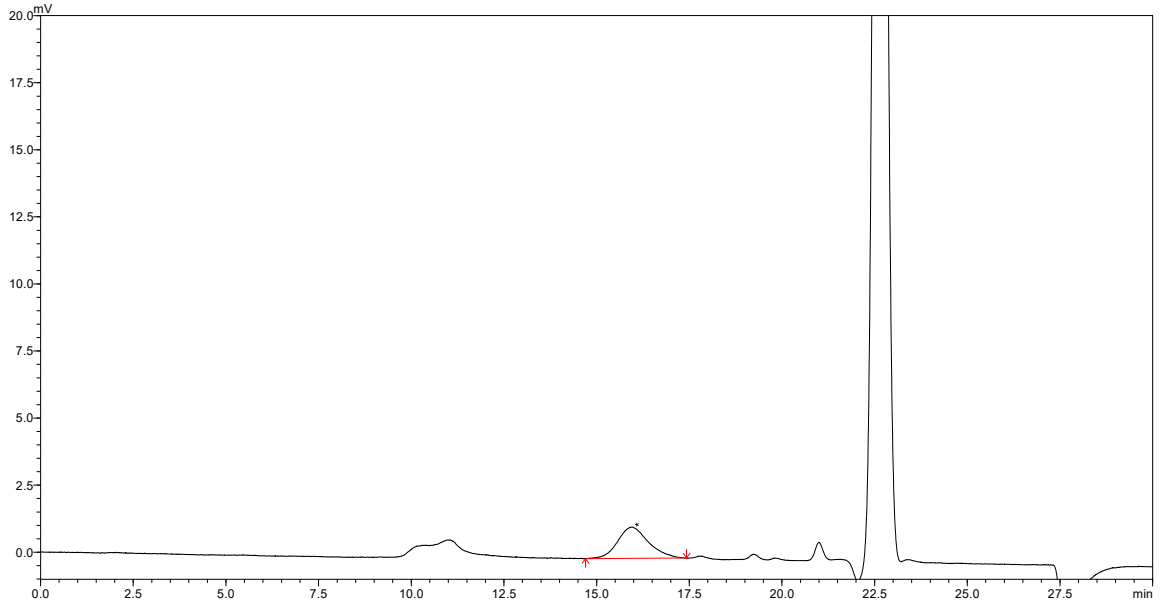


图 3: 巴氏杀菌奶样品色谱图

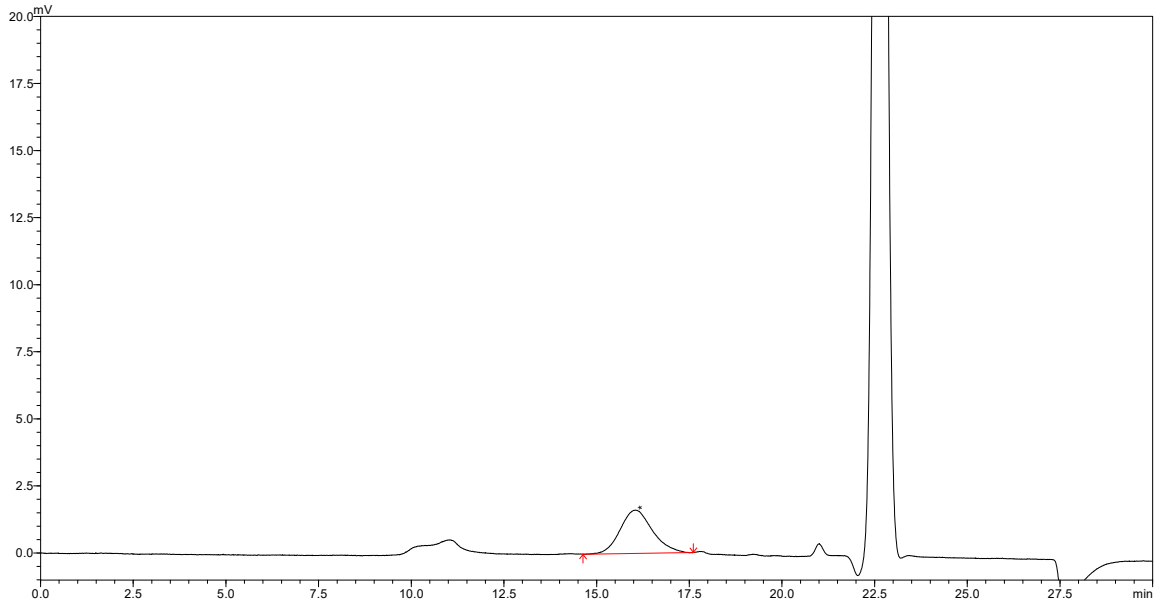


图 4: 巴氏杀菌奶样品加标 (加标量: 0.025 mg/g) 色谱图

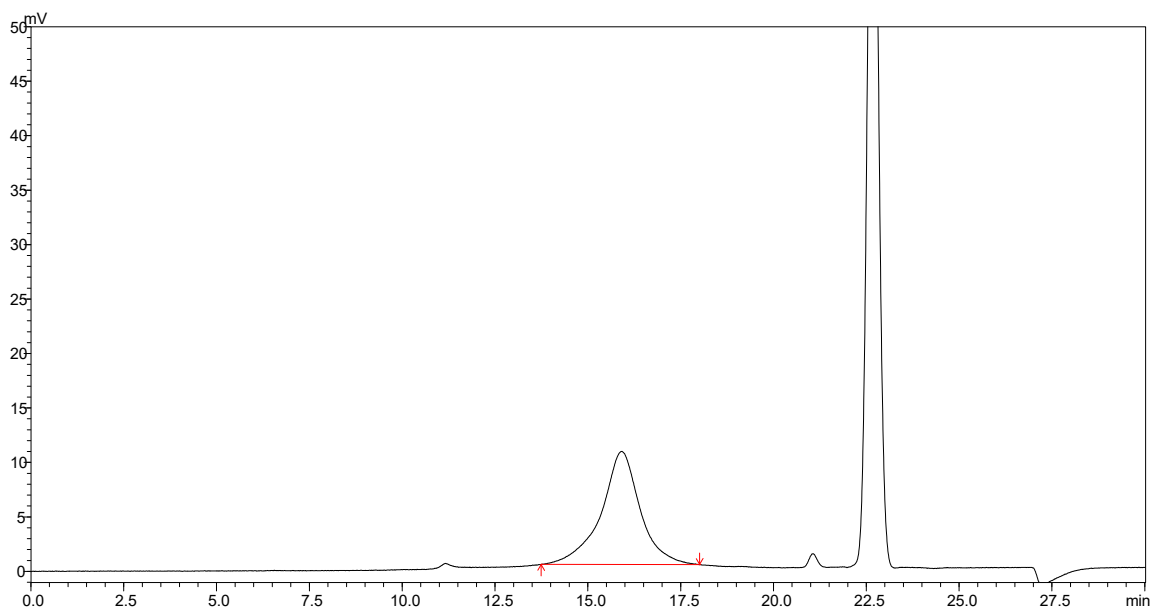


图 5: 乳粉样品色谱图

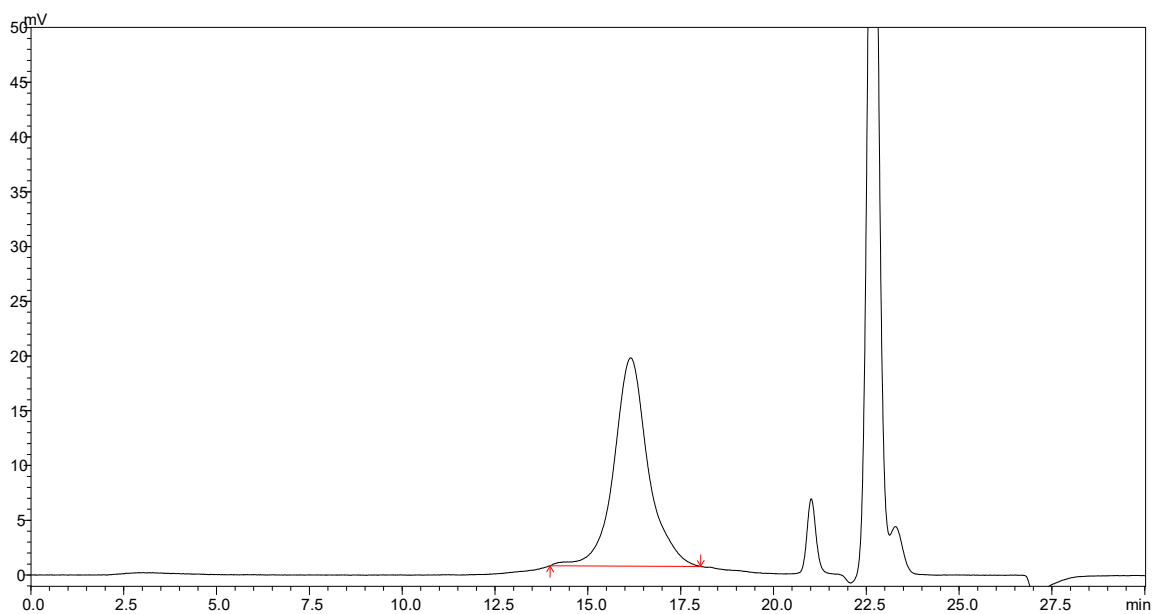


图 6: 乳粉样品加标 (加标量: 25 mg/g) 色谱图

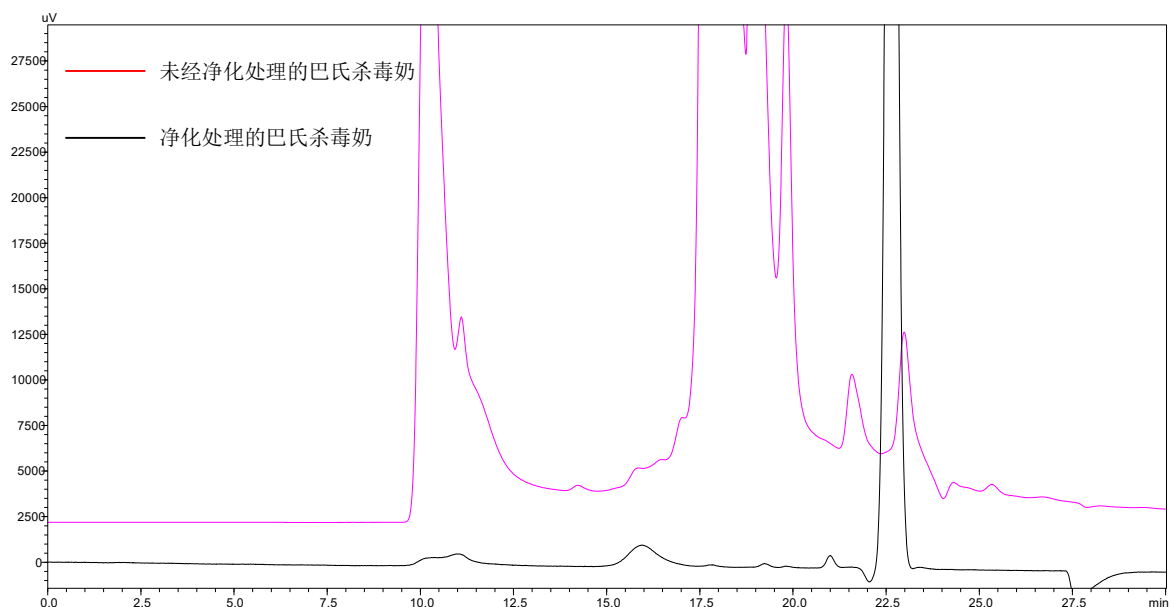


图 7：巴氏杀毒奶样品未净化、净化处理对比色谱图

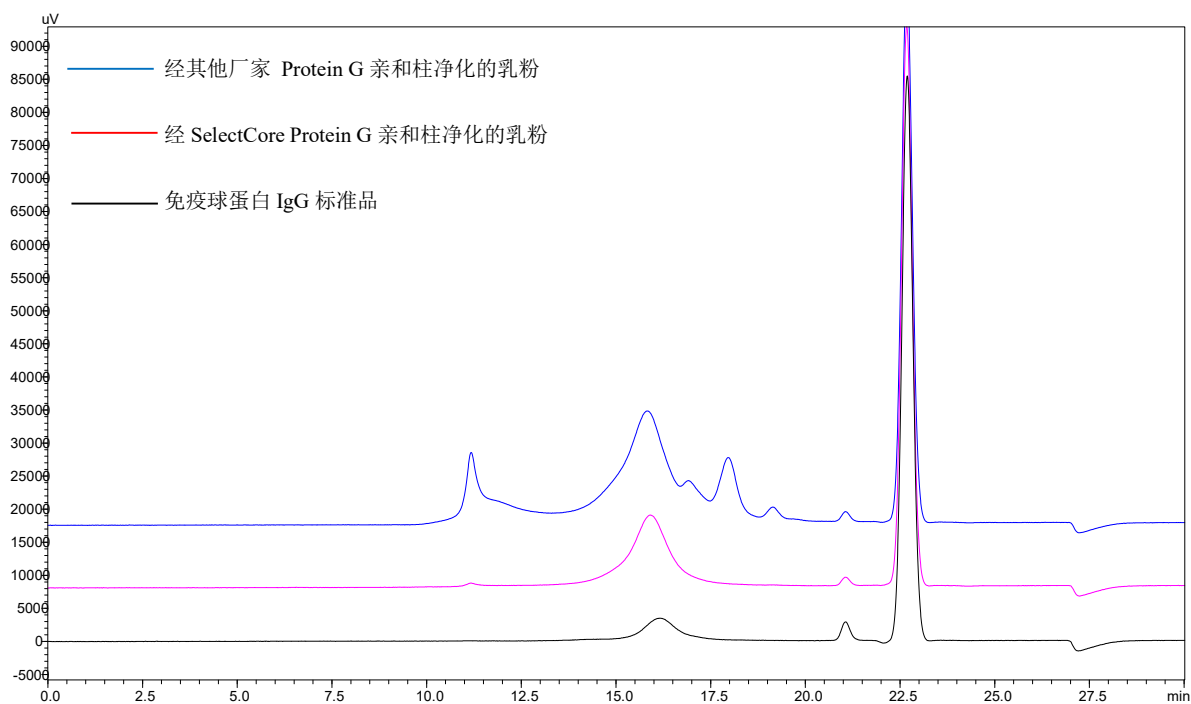


图 8：乳粉样品经 SelectCore Protein G 亲和柱及其他厂家 Protein G 亲和柱净化对比色谱图

加标回收率

样品	加标量	加标回收率
巴氏杀毒奶	0.025 mg/g	105.39%
乳粉	25 mg/g	106.44%

实验结论

本文参照国标方法，选择亲和固相萃取净化结合高效体积排阻色谱法，有如下优势：

- 1) 亲和固相萃取过程中可去除掉杂蛋白干扰，使得 IgG 的检测不受影响，从图 7 可以看出，未经净化处理的巴氏杀毒奶样品色谱图目标物附近基线波动很大，受基质干扰较强，目标物峰型较差，无法进行积分操作；从图 8 可以看出，相同的样品经其他厂家的 Protein G 亲和柱处理后，峰型虽然比未处理前有所改善，但是目标物周围的杂蛋白依旧存在干扰积分的现象。而经纳谱分析的 SelectCore Protein G 亲和柱净化处理后的样品目标物不受干扰，可准确进行积分操作；
- 2) 亲和固相萃取方法可选择性富集 IgG，保证了巴氏杀毒奶这种 IgG 含量较低的乳制品也能准确定量，并且回收率良好；
- 3) 参考国标方法，对液相色谱分析条件也进行了优化，对于 IgG 这类的生物大分子，如果采用常规的反相色谱柱无法进行分析，因此选择了更加适合本项目的高效体积排阻 SEC 分析柱，实验过程中同时也验证了此款分析柱的残留性，在较高浓度的 IgG 标准品分析结束后，立即测试色谱柱中 IgG 的残留量，由图 2 的色谱图可以得知，几乎没有任何残留，保证了样品分析结果的真实可靠。