

# 利用 Agilent 7100 毛细管电泳系统对牛奶中的 A2 $\beta$ -酪蛋白进行分析

## 作者

周洁, 孟颖  
安捷伦科技(中国)有限公司

## 前言

牛乳是重要的营养物质, 其中包含的蛋白质主要分为酪蛋白(CN)和乳清蛋白两种, 且酪蛋白占 80%<sup>[1]</sup>。牛乳中的酪蛋白主要包括 4 种亚型:  $\alpha$ S1-CN、 $\alpha$ S2-CN、 $\beta$ -CN 和  $\kappa$ -CN, 其中  $\beta$ -CN 约占 CN 的 40%<sup>[2]</sup>。迄今为止已发现牛乳中含有 10 余种  $\beta$ -CN 变异体, 其中最主要的两种是 A1 $\beta$ -CN (以下简称 A1 蛋白) 和 A2 $\beta$ -CN (以下简称 A2 蛋白)<sup>[3]</sup>。A1 蛋白和 A2 蛋白的唯一区别在于其一级结构的第 67 位氨基酸不同: A1 蛋白的第 67 位氨基酸为组氨酸, 而 A2 蛋白的第 67 位氨基酸为脯氨酸<sup>[4]</sup>。尽管这两种酪蛋白的差别细微, 但在人体内消化后会产生不同的生物活性肽<sup>[5]</sup>。研究表明, A1 蛋白产生的  $\beta$ -酪啡肽-7 可诱发多种疾病, 而 A2 蛋白则不产生  $\beta$ -酪啡肽-7<sup>[6]</sup>。因此, 开发一种分离并检测 A1 蛋白和 A2 蛋白的方法具有重要意义。

目前 A1 蛋白和 A2 蛋白的分离检测方法主要包括基因测序法、LC-MS/MS 法<sup>[7]</sup>和毛细管电泳法<sup>[8]</sup>等。但基因测序法无法检测乳制品, 而只能用于分析生产乳制品的奶牛; 对于 LC-MS/MS 法, 牛奶样品由于成分复杂且包含大量蛋白质, 因此通常会导致色谱柱污染和仪器吸附等问题, 对仪器成本和使用寿命都构成较大的挑战。

本研究参考已发表的毛细管电泳法, 利用 Agilent 7100 毛细管电泳系统对 A1 蛋白和 A2 蛋白进行分离检测, 所得结果良好, 方法重现性高。

## A2 奶分析

分离缓冲溶液和样品稀释液的配制：

以水作溶剂，分别配制 10 mol/L 尿素、0.2 mol/L  $\text{Na}_2\text{HPO}_4$ 、1.0 mol/L 柠檬酸和 1%（质量分数）HPMC 作为储备液。

分离缓冲溶液：分别移取 10 mL 尿素、6.25 mL  $\text{Na}_2\text{HPO}_4$ 、3.5 mL 柠檬酸和 5 mL HPMC 储备液，置于同一 25 mL 容量瓶中，用超纯水稀释并定容。

样品稀释液：分别移取 5 mL  $\text{Na}_2\text{HPO}_4$ 、2 mL 柠檬酸和 12.5 mL 尿素储备液，均置于同一 25 mL 容量瓶中，用超纯水稀释并定容。

### Agilent 7100 毛细管电泳条件

毛细管的活化：在 2 bar 下，依次使用 0.1 mol/L NaOH、0.1 mol/L HCl、去离子水和分离缓冲液冲洗 30、2、2 和 10 min

每两针运行间毛细管的冲洗：在 2 bar 下，依次使用 0.1 mol/L NaOH、0.1 mol/L HCl、去离子水和分离缓冲液依次冲洗 2、1、2 和 3 min

熔融石英毛细管：50  $\mu\text{m} \times 30 \text{ cm}$ （有效长度）/38.5 cm（总长度）

毛细管温度：38  $^{\circ}\text{C}$

分离电压：20 kV

进样压力及进样时间：35 mbar，10 s

检测波长：214 nm

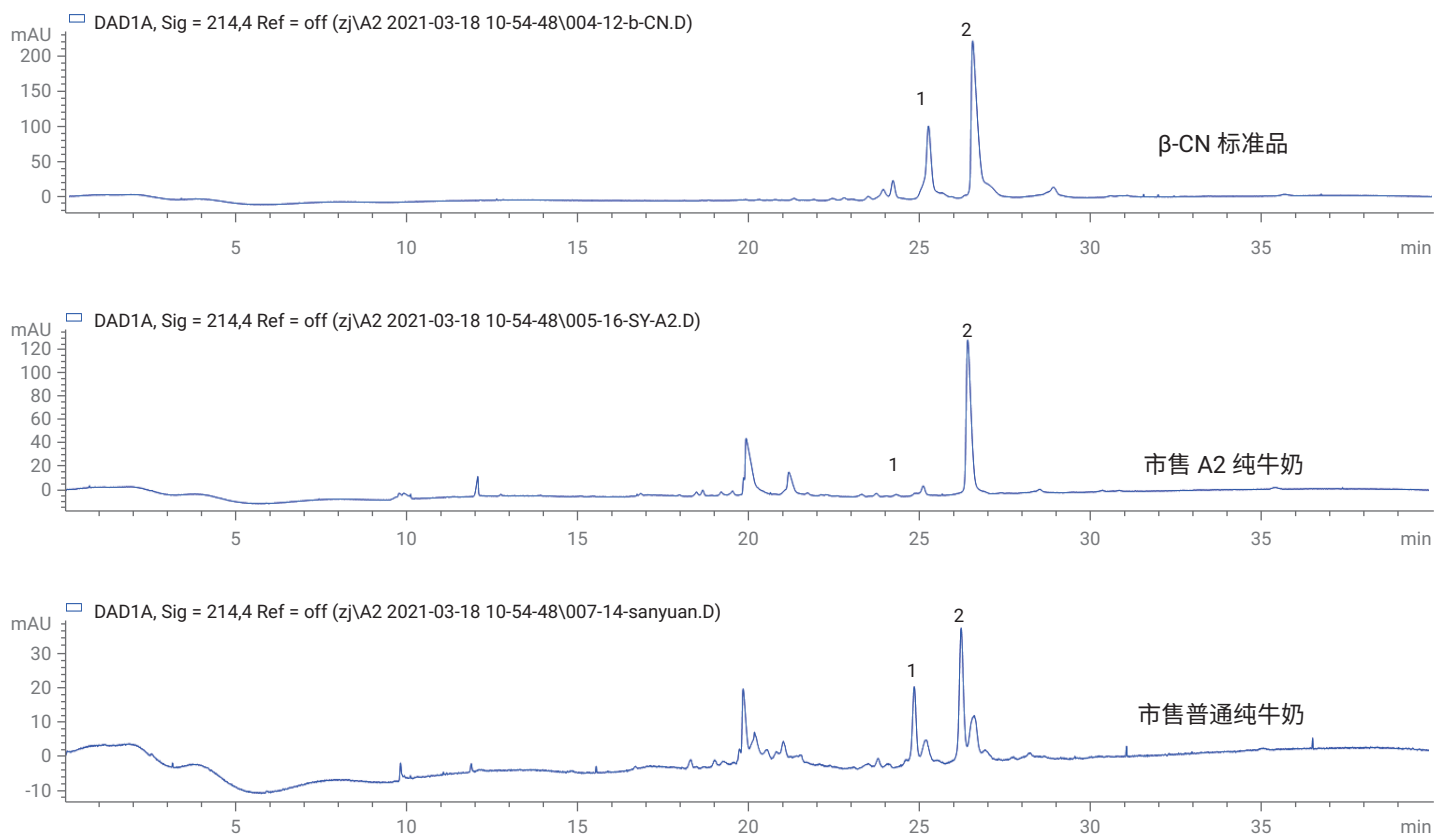


图 1.  $\beta\text{-CN}$  标准蛋白、市售 A2 纯牛奶和市售普通纯牛奶的进样分析结果：峰 1 为 A1 $\beta\text{-CN}$ ，峰 2 为 A2 $\beta\text{-CN}$

利用 Agilent 7100 毛细管电泳系统分别进样分析  $\beta$ -CN 标准品、市售 A2 纯牛奶和市售普通纯牛奶，所得结果见图 1。从图中可以看出，A1 $\beta$ -CN 与 A2 $\beta$ -CN 在 40 min 内获得了良好的分离，与参考文献<sup>[9]</sup>报道的分离结果基本一致；而且在购买的某品牌 A2 纯牛奶中检出极低含量的 A1 $\beta$ -CN。与仅仅通过基因测序法确定奶牛并用确定的奶牛对所得牛奶进行定性的方法相比，毛细管电泳法更可靠，有利于实现更严格的产品质量控制。同时，本文所述的毛细管电泳法无需采用复杂的样品前处理过程，并且对毛细管柱要求较低，具有更出色的耐用性。总之，该方法适用于乳制品企业质量控制部门实施的大批量检测。

## 参考文献

1. NGUYEN D D, SOLAH V A, BUSETTI F, et al. Application of Ultra-High Performance Liquid Chromatography Coupled to high-Resolution Mass Spectrometry (Obitrap™) for the Determination of Beta-Casein Phenotypes in Cow Milk. *Food Chemistry*, 2020, 307: 125532-1-125532-4
2. ASLEDOTTIR T, LE T T, PETRAT-MELIN B, et al. Identification of Bioactive peptides and Quantification of  $\beta$ -Casomorphin-7 from bovine  $\beta$ -casein A1, A2 and I after ex vivo Gastrointestinal Digestion. *International Dairy Journal*, 2017, 71: 98-106
3. FARRELL H M, JIMENEZ – FLORES R, BLECK G T, et al. Nomenclature of the Proteins of Cows' Milk: Sixth Revision. *Journal of Dairy Science*, 2004, 87(6): 1641-1674
4. GIGLIOTI R, GUTMANIS G, KATIKI L M, et al. New High-Sensitive rhAmp Method for A1 Allele Detection in A2 Milk Samples. *Food Chemistry*. 2020, 313: 126167-1-126167-7
5. BOUTROU R, GAUDICHON C, DUPONT D, et al. Sequential Release of Milk Protein – Derived Bioactive Peptides in the Jejunum in Healthy Humans. *The American Journal of Clinical Nutrition*. 2013, 97(6): 1314-1323
6. BELL S J, GROCHOSKI G T, CLARKE A J. Health Implications of Milk Containing Beta – Casein with the A2 Genetic Variant. *Critical Reviews in Food Science and Nutrition*. 2006, 46(1): 93-100
7. 刘泽阳, 李明, 吴佩泽等. 液相色谱-高分辨串联质谱法检测牛奶中 A1 和 A2 $\beta$ -酪蛋白. *吉林大学学报 (理学版)*, 2021, 59(3): 696-702
8. 冯憑, 丁晓静, 高铁等. 毛细管区带电泳测定液态奶及奶粉中的 A2 $\beta$ -酪蛋白及总  $\beta$ -酪蛋白. *色谱*, 2020, 38(6): 722-729

查找当地的安捷伦客户中心:

[www.agilent.com/chem/contactus-cn](http://www.agilent.com/chem/contactus-cn)

免费专线:

800-820-3278, 400-820-3278 (手机用户)

联系我们:

[LSCA-China\\_800@agilent.com](mailto:LSCA-China_800@agilent.com)

在线询价:

[www.agilent.com/chem/erfq-cn](http://www.agilent.com/chem/erfq-cn)



微信搜一搜

安捷伦视界

[www.agilent.com](http://www.agilent.com)

DE39755537

安捷伦对本资料可能存在的错误或由于提供、展示或使用本资料所造成的间接损失不承担任何责任。

本文中的信息、说明和指标如有变更,恕不另行通知。

© 安捷伦科技(中国)有限公司, 2024  
2024年3月21日, 中国出版  
5994-4416ZHCN

