

# 乳及乳制品中乳铁蛋白含量的快速SDS-PAGE 荧光检测方法

李汉芳, 黄珍, 路梦凡, 孙娜娜, 徐丹, 徐秦峰\*

(陕西科技大学食品科学与工程学院, 陕西西安 710021)

**摘要:** 该研究采用新型的 Chromeo P503 (P503) 染料替代考马斯亮蓝染色方法, 以克服脱色染色步骤繁琐、耗时长 ( $\geq 5$  h) 的不足, 建立一种乳及乳制品中乳铁蛋白的快速简便十二烷基硫酸钠-聚丙烯酰胺凝胶电泳 (Sodium Dodecyl Sulfate-Polyacrylamide Gel Electrophoresis, SDS-PAGE) 检测方法。P503 染料标记蛋白产生强烈的红色荧光发射, 在 30 min 内一步操作即可完成, 并且进行脱铁处理后消除乳铁蛋白铁饱和度对于荧光信号的干扰, 保证定量的准确性。根据凝胶成像图中 78 ku 蛋白条带是否存在及其灰度值的大小, 实现乳铁蛋白的定性与定量检测。在优化的实验条件下, 线性范围为 15~75  $\mu\text{g}/\text{mL}$ , 检出限为 5.11  $\mu\text{g}/\text{mL}$ , 加标回收率在 75.79%~108.09% 之间, 表明该方法具有较高的灵敏度和准确性。SDS-PAGE 和 P503 结合无需进行肝素亲和柱前处理, 便可直接应用于乳及乳制品中乳铁蛋白快速简便的准确定量检测, P503 染料标记还可以用于其它乳蛋白的 SDS-PAGE 快速低成本定量检测, 从而为乳品质量控制和营养评价及加工工艺研究提供有力工具。

**关键词:** 乳铁蛋白; 十二烷基硫酸钠-聚丙烯酰胺凝胶电泳; Chromeo P503; 快速标记

文章编号: 1673-9078(2024)04-296-302

DOI: 10.13982/j.mfst.1673-9078.2024.4.0968

## Rapid SDS-PAGE Fluorescent Detection Method for Lactoferrin Content in Milk and Dairy Products

LI Hanfang, HUANG Zhen, LU Mengfan, SUN Nana, XU Dan, XU Qinfeng\*

(School of Food Science and Engineering, Shaanxi University of Science & Technology, Xi'an 710021, China)

**Abstract:** A novel dye (Chromeo P503, P503) was used as an alternative to Coomassie brilliant blue to address the drawbacks associated with the laborious and time consuming ( $\geq 5$  h) staining and destaining processes. This facilitated the establishment of a rapid and simple sodium dodecyl sulfonate-polyacrylamide gel electrophoresis (SDS-PAGE) method for the detection of lactoferrin in milk and dairy products. P503 dye-labeled protein emits strong red fluorescence, which could be completed in one step within 30 min. The interference of lactoferrin iron saturation on fluorescence signal was eliminated after apolactoferrin preparation to ensure the accuracy of quantification. Qualitative and quantitative detection of lactoferrin was achieved based on the presence of a 78 ku protein band and its gray value in the gel image. Under optimized

引文格式:

李汉芳, 黄珍, 路梦凡, 等. 乳及乳制品中乳铁蛋白含量的快速SDS-PAGE荧光检测方法[J]. 现代食品科技, 2024, 40(4): 296-302.

LI Hanfang, HUANG Zhen, LU Mengfan, et al. Rapid SDS-PAGE fluorescent detection method for lactoferrin content in milk and dairy products [J]. Modern Food Science and Technology, 2024, 40(4): 296-302.

收稿日期: 2023-08-15

基金项目: 陕西省教育厅项目 (22JC008); 陕西省科技厅项目 (2021NY-174)

作者简介: 李汉芳 (1999-), 女, 硕士研究生, 研究方向: 食品质量与安全, E-mail: 1966853439@qq.com

通讯作者: 徐秦峰 (1983-), 男, 博士, 教授, 研究方向: 食品质量与安全, E-mail: xuqinfeng@sust.edu.cn

experimental conditions, the linear range was 15~75  $\mu\text{g/mL}$ , and the limit of detection was 5.11  $\mu\text{g/mL}$ , with a recovery of 75.79%~108.09%, indicating that this method has high sensitivity and accuracy. The combination of the SDS-PAGE and P503 methods enabled the rapid, simple, and accurate detection of lactoferrin in milk and dairy products, eliminating the need pretreatment of the heparin affinity column. P503 dye labeling can facilitate rapid and low-cost quantitative detection of other milk proteins using SDS-PAGE, providing a valuable tool for dairy quality control, nutrition evaluation, and processing technology research.

**Key words:** lactoferrin; sodium dodecyl sulfate-polyacrylamide gel electrophoresis; chromeo p503; rapid staining

乳铁蛋白 (Lactoferrin, Lf) 是一种具有抗菌、抗病毒、增加成骨活性、降低腹泻发病率、促进肠道健康等多种生理活性的铁结合糖蛋白<sup>[1-3]</sup>, 例如最近研究发现, Lf 能够辅助治疗新冠肺炎<sup>[4]</sup>。同时, Lf 对热敏感, 加工工艺不同导致不同产品中的 Lf 含量差异很大, 因此检测各种乳制品中 Lf 的含量对其营养价值和热加工风险评估具有重要意义<sup>[5,6]</sup>。

作为乳蛋白分离检测的常用方法, 十二烷基硫酸钠-聚丙烯酰胺凝胶电泳 (Sodium Dodecyl sulfate-polyacrylamide Gel Electrophoresis, SDS-PAGE)<sup>[7-11]</sup>能够将 Lf 与其它乳蛋白很好的分离开, 无需用肝素亲和柱纯化样品, 因此广泛用于乳及乳制品中 Lf 含量的检测。考马斯亮蓝 (Coomassie Brilliant Blue, CBB) 是最常用的染色方法, 但是存在染色脱色步骤繁琐、灵敏度较差的不足, 如 Brisson 等<sup>[12]</sup>通过还原及非还原 SDS-PAGE 两种方法表征了不同铁饱和度对乳铁蛋白热聚集的影响, 凝胶需要过夜固定蛋白、37  $^{\circ}\text{C}$  染色 1 h 以及多次更换乙酸脱色, 李珊珊等<sup>[13]</sup>通过 SDS-PAGE 法实现乳制品中 Lf 的定量检测, 凝胶需过夜染色、脱色 2 h; 邢志恩等<sup>[14]</sup>通过 CBB 染色和薄层扫描测定了 3 种不同来源的 Lf, 克服了溶剂大量损耗的缺点; 但染色 3 h、脱色 2 h 的过程仍然烦琐耗时。

为了克服这种局限, 本文采用了一种新型染色试剂 Chromeo P503 (P503) 来替代 CBB 染色, 研究建立一种乳及乳制品中 Lf 含量的 SDS-PAGE 简便快速检测方法。由于 P503 标记蛋白呈现强烈的红色荧光发射, 量子产率高 (>50%); 而游离染料量子产率较低 (<1%)<sup>[15]</sup>, 因此无需进行洗脱以降低背景。在优化实验条件下, 该方法中蛋白染色仅需一步操作, 便可直接应用于乳及乳制品中 Lf 的准确定量检测, 检测速度和灵敏度 (30 min, 5.11  $\mu\text{g/mL}$ ) 均显著优于 CBB 染色 (>5 h, 29  $\mu\text{g/mL}$ )<sup>[13,14]</sup>, 可为含乳铁蛋白制品的营养价值评价、质量监管和加

工工艺研究提供有力工具。

## 1 材料与方法

### 1.1 主要试剂和仪器

天然 Lf (纯度 $\geq 95\%$ ), 日本 Wako 公司; 铁饱和 Lf (纯度 $\geq 85\%$ )、 $\beta$ -乳球蛋白 ( $\beta$ -Lactoglobulin,  $\beta$ -LG, 纯度 $\geq 90\%$ )、酪蛋白 (Casein, CN)、牛血清白蛋白 (Bovine Serum Albumin, BSA, 纯度 $\geq 98\%$ )、碳酸氢钠 (纯度 $\geq 99.5\%$ )、柠檬酸 (纯度 $\geq 99.5\%$ )、磷酸盐缓冲液 (PBS) 粉末、Chromeo P503, 美国 Sigma 公司; 免疫球蛋白 G (Immunoglobulin G, IgG, 纯度 $\geq 90\%$ ), 上海源叶生物科技有限公司; QC0140 肝素亲和柱, 北京美正生物科技有限公司; Athena C4 色谱 (250 mm $\times$ 4.6 mm $\times$ 5  $\mu\text{m}$ , 300 $\text{\AA}$ ), 上海安谱实验科技有限公司; 12% 电泳预制胶、考马斯亮蓝 R-250、蛋白 Marker, 上海生工生物工程公司; 乙二胺四乙酸二钠盐 (分析纯), 上海生工生物工程公司; 液态奶、奶粉样品购买自当地超市。

Mini-PROTEIN Tetra System 垂直电泳仪, 美国 Bio-Rad 公司; OS-03U 摇床, 北京六一生物科技有限公司; FS5 荧光光谱仪, 英国 Edinburgh 公司; DK-8D 电热恒温水槽, 上海精宏实验设备有限公司; OSE-470P 蓝光凝胶成像系统, 北京天根生化科技有限公司; Nanodrop One 超微量紫外分光光度计、U3000 液相色谱仪 (配备紫外检测器), 美国 Thermo Fisher Scientific 公司; BS/BT 型电子天平 (精度 0.000 1 g), 德国 Sartorius 公司; 5424R 高速冷冻离心机, 德国 Eppendorf 公司。

### 1.2 实验方法

#### 1.2.1 条件优化

##### 1.2.1.1 铁饱和度对 P503 标记 Lf 的影响

参照文献<sup>[16]</sup>制备脱铁 Lf, 在 100.0  $\mu\text{L}$  质量浓度为 5  $\text{mg/mL}$  的 Lf 中, 加入乙二胺四乙酸二钠盐

(0.5 mol/L) 10.0  $\mu\text{L}$ 、柠檬酸 (1 mol/L) 2.0  $\mu\text{L}$ ，孵育 1 h 后进行 5 次超滤 (30 ku) 以除去螯合剂。Lf 的标记反应如下：1.0  $\mu\text{L}$  质量浓度为 10 mg/mL 的脱铁 Lf、天然 Lf、铁饱和 Lf，加入 1.0  $\mu\text{L}$  的 P503 (0.2 mg/mL)、2.0  $\mu\text{L}$  碳酸氢钠缓冲液 (pH 值 9) 和 6.0  $\mu\text{L}$  超纯水混匀；1.0  $\mu\text{L}$  质量浓度为 10 mg/mL 的脱铁 Lf、天然 Lf、铁饱和 Lf 及 P503 (0.2 mg/mL)，加入 2.0  $\mu\text{L}$  碳酸氢钠缓冲液 (pH 值 9) 和 7.0  $\mu\text{L}$  超纯水混匀作为对照，50  $^{\circ}\text{C}$  孵育 30 min 后进行光谱扫描。

荧光光谱扫描条件：激发光谱，固定最大发射波长为 620 nm，激发波长范围 400~580 nm，狭缝为 1.5 nm；发射光谱，固定最大激发波长为 500 nm，激发波长范围 520~750 nm。取 2.0  $\mu\text{L}$  的不同铁饱和度 Lf 及 P503-Lf 标记样品，在 Nanodrop 仪器上进行紫外可见全光谱扫描。

#### 1.2.1.2 P503 标记条件优化

在标记比例优化实验中，固定 Lf 质量浓度终浓度为 1 mg/mL，改变 P503 用量使 P503 染料与 Lf 的摩尔比分别为 1:1、2:1、4:1、5:1、6:1、8:1、10:1，孵育条件、荧光发射光谱扫描条件同 1.2.1，扫描频率：每分钟一次。孵育温度实验中，Lf (10 mg/mL) 取 1.0  $\mu\text{L}$ ，加入 1.0  $\mu\text{L}$  的 P503 (0.2 mg/mL)、2.0  $\mu\text{L}$  碳酸氢钠缓冲液 (pH 值 9)，加入超纯水至 10.0  $\mu\text{L}$  混匀，温度设置 40、50、60、70 $^{\circ}\text{C}$ ，扫描频率同上。

### 1.2.2 P503 染色检测线性范围及其与 CBB 染色对比

#### 1.2.2.1 P503 染色检测线性范围

PBS (1 $\times$ ) 稀释脱铁 Lf 至 1 mg/mL 后分别取 0、0.2、0.4、0.6、0.8、1.0  $\mu\text{L}$ ，加入 1.0  $\mu\text{L}$  的 P503 (0.2 mg/mL)、2.0  $\mu\text{L}$  碳酸氢钠缓冲液 (pH 值 9)，加入超纯水至 10.0  $\mu\text{L}$  混匀；50  $^{\circ}\text{C}$  孵育 30 min 后加入 2.5  $\mu\text{L}$  的 Loading buffer，(95.0 $\pm$ 0.5)  $^{\circ}\text{C}$  孵育 5 min，室温冷却；分离胶质量分数 12%、浓缩胶质量分数 5%；恒压电泳，浓缩电压 90 V，时间 30 min，分离电压 120 V，时间 60 min；为防止荧光光漂白，电泳过程应在避光条件下进行，通过蓝光凝胶成像系统观察实验结果。

#### 1.2.2.2 P503 染色检测的精密度及稳定性

终质量浓度均为 0.01 mg/mL 的 Lf 样品 (标记方法同上) 在同一凝胶上做 9 个平行样进行电泳，读取灰度值及计算后相对标准偏差 RSD。重复 1.2.2.1 标准曲线 3 次并对不同凝胶上同一乳品样品采用相同方法计算 RSD。

#### 1.2.2.3 CBB 染色检测线性范围

样品除 P503 染色外均与 1.2.2.1 相同，电泳结束后进行 CBB 染色。在半径 12 cm 的培养皿里加入 1 $\times$  考马斯亮蓝 R-250 染色液 60 mL，摇床 50 r/min，染色 1 h，0.0、0.5、1.5、3.0 h 时各加入 80 mL 脱色液 ( $\phi$ =40% 无水乙醇、 $\phi$ =10% 冰乙酸、 $\phi$ =50% 水)，过夜脱色。使用数据处理软件 WCIF Image J 采集条带灰度值。

### 1.2.3 实际乳品样品检测

10 mg/mL 的  $\beta$ -LG、CN、BSA、IgG、脱铁 Lf 样品分别取 0.5  $\mu\text{L}$  加入 1.0  $\mu\text{L}$  的 P503 (0.2 mg/mL)、2.0  $\mu\text{L}$  碳酸氢钠缓冲液 (pH 值 9) 和 6.0  $\mu\text{L}$  超纯水混匀；5 种蛋白各取 0.5  $\mu\text{L}$  混合加入 1.0  $\mu\text{L}$  的 P503 (0.2 mg/mL)、2.0  $\mu\text{L}$  碳酸氢钠缓冲液 (pH 值 9) 和 4.5  $\mu\text{L}$  超纯水混匀，进行 SDS-PAGE 检测，检测条件同 1.2.2。

奶粉样品：称取牛乳粉 0.100 0 g，PBS (1 $\times$ ) 定容至 2 mL。牛乳粉 12 000 r/min、4  $^{\circ}\text{C}$ 、10 min 离心除脂，收集中间层，重复两次。

液态乳样品：超瞬时杀菌 (Infusion Technology, INF) 乳、超高温瞬时灭菌 (Ultra High Temperature Treated, UHT) 乳 12 000 r/min、4  $^{\circ}\text{C}$ 、10 min 离心除脂，收集中间层，重复两次。随后的脱铁和 P503 溶液标记反应步骤同上，P503 浓度调整为 0.5 mg/mL，SDS-PAGE 检测条件同 1.2.2.1。

用于高效液相色谱 (High Performance Liquid Chromatography, HPLC) 检测实验的乳品样品，参照肝素亲和柱产品使用说明书的步骤进行前处理和 HPLC 上机检测。HPLC 检测参数：柱温 30  $^{\circ}\text{C}$ ，进样量 30  $\mu\text{L}$ ，洗脱时间 18 min，洗脱程序参照美正亲和柱说明书 2020 版本，检测波长 280 nm。

### 1.3 数据处理

高效液相定量数据峰面积由 Chromeleon 7 软件获得，SDS-PAGE 条带灰度值由 WCIF Image J 采集，实验数据为  $n$  次重复实验的均值，数据统计分析采用 Origin 9.0。

## 2 结果与分析

### 2.1 条件优化

#### 2.1.1 铁饱和度对 P503 标记 Lf 的影响

P503 是一种伯胺标记染料，对 Lf 进行标记后，

显示强烈的红色荧光发射信号,如图 1a 所示,与文献报道一致<sup>[15]</sup>。对于相同浓度的不同铁饱和度 Lf,虽然均可观察到荧光增强,但是强度的增加却存在显著差异。缺铁 Lf (Apo-Lf)、天然 Lf (Native-Lf) 和铁饱和 Lf(Holo-Lf) 的铁饱和度<sup>[16,17]</sup>分别为 0.2%、14%、99.7%,其标记后对应的荧光强度逐渐降低,表明铁饱和度会对 P503 标记 Lf 造成影响。

为了探究造成荧光猝灭的原因,扫描了铁饱和 Lf 的吸收光谱(图 1b),结果显示其在 465 nm 处有最大吸收峰,对应 Lf 中铁元素的特征吸收<sup>[17-19]</sup>。该吸收峰与 P503 标记 Lf 的荧光激发光谱重叠(图 1b),所以铁饱和 Lf 会吸收 P503 的激发光能量,从而导致荧光发射信号变弱(即内滤效应)。因此,在后续检测中,均采用脱铁 Lf 进行检测。

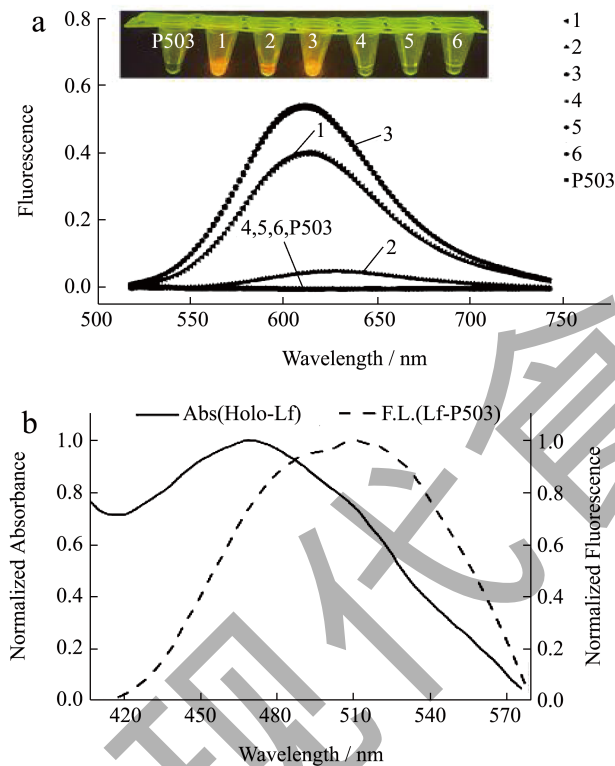


图 1 P503 标记不同铁饱和度 Lf 的光谱图  
Fig.1 Spectra of P503 labeled Lf with different iron saturation (n=5)

注:(a) P503 染料标记不同铁饱和度 Lf 的发射光谱,1~6 分别表示 P503+Native-Lf、P503+Holo-Lf、P503+Apo-Lf、Native-Lf、Holo-Lf、Apo-Lf;(b) Holo-Lf 的吸收光谱和 P503 标记的 Holo-Lf 的激发光谱。

### 2.1.2 P503 标记条件优化

进一步对 P503 标记 Lf 的条件进行了优化,实验了 P503 染料与 Lf 标记比例 (Dye/Protein Ratios,

DPRs)、孵育时间及温度对荧光信号强度的影响,结果如图 2 所示。荧光信号强度随着温度变化而不同,50 °C 孵育时信号强度最高,因此选择 50 °C 作为孵育温度进行后续实验;随着染料标记比例增加,荧光强度呈现先增加后降低的趋势,导致荧光强度降低的原因可能是染料的自猝灭;当染料蛋白比例为 4 时,信号较为稳定,偏差较小。荧光强度在 5 min 内迅速增加随后的 50 min 内缓慢增加,因此选择 30 min 作为孵育时间进行后续实验。

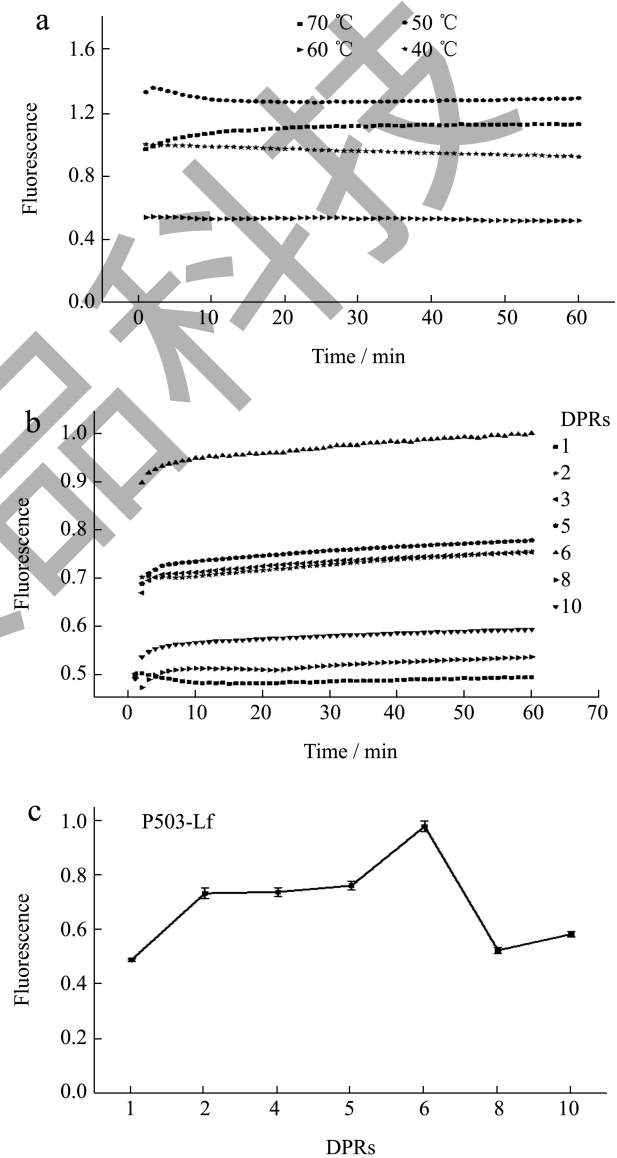


图 2 染料标记 Lf 条件优化

Fig.2 P503 label Lf condition optimization (n=6)

注:(a) P503/Lf 不同标记温度荧光扫描图;(b) P503/Lf (摩尔比)的标记时间荧光扫描图,标记温度为 50 °C;(c) P503/Lf (摩尔比)标记比例荧光扫描图,30 min 标记。

## 2.2 P503染色检测线性范围及其与CBB染色对比

SDS-PAGE 是基于蛋白质分子量差异和凝胶的分子筛作用进行分离, 通过电泳作用后染色剂显示的蛋白条带强弱不同进行定量分析。相较于传统的 CBB 染色、洗脱过程, 本方法所用的 P503 染料在 pH 值 8~9 环境中标记仅需 30 min, 在电泳后即可通过蓝光凝胶成像系统和 WCIF Image J 读取灰度值对蛋白进行定量, 可以避免长达数小时的染色脱色过程。

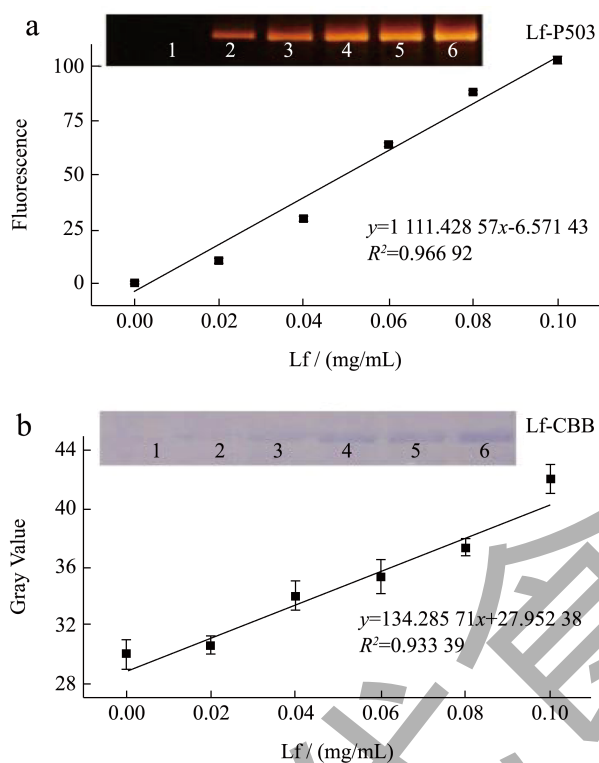


图3 不同浓度 Lf 的电泳图及标准曲线图

Fig.3 Electrophoretic diagram and standard curve of lactoferrin at different concentrations ( $n=3$ )

注: (a) P503 染色的 SDS-PAGE 检测 Lf 电泳结果及标准曲线; (b) CBB 染色的 SDS-PAGE 检测 Lf 电泳结果及标准曲线; Lane 1~Lane 6 的 Lf 含量分别为: 0、200、400、600、800、1 000 ng。

为了验证所建立的 SDS-PAGE 法可以用于 Lf 的定量检测, 将不同质量浓度的 Lf 标准品分别和 P503 进行混合孵育, 结合缓冲液做空白对照, 采集各复合物灰度值。荧光成像后再按照传统的步骤进行 CBB 染色成像, 作为对照。结果如图 3 所示: 随 Lf 质量的增加, 复合物条带的荧光强度和蓝色亮度均不断增大。采集各泳道复合物灰度值, 以 Lf 的质量浓度为横坐标, Lf-P503 荧光强度值为纵坐标的曲线回归方程为  $y=1111.42857x-6.57143$ ,

$R^2=0.96692$ ; CBB 染色的线性回归方程为  $y=134.28571x+27.95238$ ,  $R^2=0.93339$ 。结果表明采用 P503 染色 ( $5.11 \mu\text{g/mL}$ ) 的检测灵敏度和线性均优于 CBB 染色 ( $29 \mu\text{g/mL}$ )<sup>[13]</sup>, 并且 P503 染色的时间仅为 30 min, 一步即可完成, 操作步骤更为简便快速 (CBB 染色  $\geq 5$  h)。此外, 同一凝胶上同一样品信号 RSD 为 2.26%, 不同凝胶上同一样品信号 RSD 均小于 4.63%, 相对标准偏差均  $\leq 10\%$ , 表明本方法测定乳及乳制品中乳铁蛋白具有较好的精密度和稳定性。

## 2.3 实际乳品样品检测

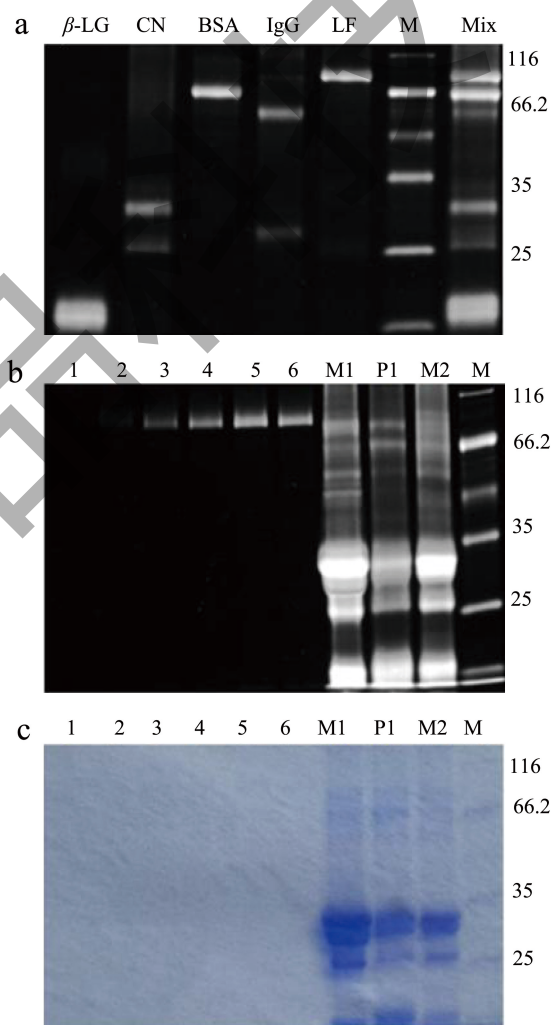


图4 实际样品检测电泳图

Fig.4 Electrophoretic diagram of actual sample detection

注: (a) P503 染色的 SDS-PAGE 检测乳蛋白电泳的凝胶成像系统拍照结果; (b) P503 染色的 SDS-PAGE 检测 Lf 电泳的凝胶成像系统拍照结果; (c) CBB 染色的 SDS-PAGE 检测 Lf 电泳结果; Lane 1~Lane 6 的 Lf 含量分别为: 0、150、300、450、600、750 ng; Lane 7~9 分别 INF 乳 (M1)、乳粉 (P1)、UHT 乳 (M2), Lane 10 为蛋白 Marker (M): 116、66.2、35、25 单位均为 ku。

为了确定 Lf 检测的准确性,进一步对常见乳蛋白:  $\beta$ -LG、CN、BSA、IgG、Lf 标准品单独样品、混合样品进行 SDS-PAGE 检测,结果如图 4a 所示,各蛋白与 Lf 分子量差异显著,不会干扰 Lf 检测。进一步验证 P503 染色法可用于检测实际样品中 Lf 含量,采用上述方法对市售的 3 种乳制品 (INF 乳、UHT 乳、牛乳粉) 简单离心除脂及脱铁后,直接进行 Lf 定量检测;添加 Lf 标准溶液,测定加标回收率。结果如图 4b 及 4c 所示,相对于 CBB 染色,乳品样品中 P503 染色 Lf 条带 (78 ku) 更加清晰。定量检测结果显示,INF 乳的 Lf 检测值高于 UHT 乳 (表 1),与预期相符同<sup>[20-22]</sup>。不同热加工工艺导致 Lf 的热损失不同,证明本方法对于液态乳的热加工风险评估具有一定的参考意义。样品的加标回收率 75.79%~108.09% (表 1),表明本方法无需繁琐前处理和复杂染色脱色过程即可实现乳制品中 Lf 的定量检测。

表 1 P503-PAGE 实际样品检测结果

Table 1 P503-PAGE actual sample test results (n=3)

样品	加标质量浓度/( $\mu$ g/mL)	加标回收率/%	RSD/%
	0	—	0.37
M1	15	82.64	0.63
	30	103.33	0.43
M2	0	—	0.88
	15	89.46	0.40
	30	108.09	0.54
P1	0	—	0.83
	15	75.79	0.74
	30	95.02	0.64

注: M 表示液态奶样品, M1-M2 分别表示 INF 乳、UHT 乳, P1 表示乳粉。

表 2 不同检测方法对比

Table 2 Comparison of different detection methods (n=3)

样品	P503-PAGE	HPLC	标示值
M1	40.85 $\pm$ 0.23	47.02 $\pm$ 0.56	32.8
M2	6.76 $\pm$ 0.32	6.46 $\pm$ 0.64	—
P1	46.58 $\pm$ 1.44	47.18 $\pm$ 0.84	45

注: M 表示液态奶样品, M1-M2 分别代表 INF 乳、UHT 乳, P1 表示乳粉。液态奶样品中 Lf 检测量单位为  $\mu$ g/mL, 奶粉样品检测量单位为 mg/100 g; “—” 表示未检出。

将本方法与经过肝素亲和柱纯化处理的 HPLC 检测结果进行对比,进一步验证方法的准确性,结果

见表 2。P503-PAGE 与 HPLC 检测值相近,表明本方法的准确性。本方法可为企业优质乳的生产过程监管以及奶粉的营养价值评估提供一定的技术支持。

### 3 结论

本研究通过 pH 值 8~9 环境中 P503 快速标记 Lf (0.5 h), 在 SDS-PAGE 后直接在蓝光凝胶成像系统下读取灰度值,通过荧光强度值和 Lf 浓度呈现的良好线性关系进行定量分析,避免了 CBB 染色方法冗长的染色脱色过程 ( $\geq$ 5 h),建立了一种省时、简便、灵敏度高的 Lf 快速检测方法。鉴于 SDS-PAGE 仪器是各实验室最为普通和常用的设备,以及所使用的蓝光凝胶成像系统成本较低,因此建立的方法具有广泛适用性。此外, P503 染色还可以用于其它乳蛋白的快速检测,从而能够为液态乳的热加工工艺的控制以及奶粉的营养价值评估提供技术支持。

### 参考文献

- [1] JANCZUK A, BRODZIAK A, CZERNECKI T, et al. Lactoferrin-the health-promoting properties and contemporary application with genetic aspects [J]. Foods, 2023, 12(1): 70-90.
- [2] DIERICK M, VANROMPAY D, DEVRIENDT B, et al. Lactoferrin, a versatile natural antimicrobial glycoprotein that modulates the host's innate immunity [J]. Biochemistry and Cell Biology, 2021, 99(1): 61-65.
- [3] 胡亚卓,刘成龙,王玉树,等.乳铁蛋白与婴幼儿健康研究进展[J].食品安全导刊,2022,11(33):139-142.
- [4] 杨跃杰,连帅,袁涛,等.乳铁蛋白辅助治疗新冠肺炎的研究进展[J].中国乳品工业,2023,51(8):29-36.
- [5] SALAR S, JAFARIAN S, MORTAZAVI A, et al. Effect of hurdle technology of gentle pasteurisation and drying process on bioactive proteins, antioxidant activity and microbial quality of cow and buffalo colostrum [J]. International Dairy Journal, 2021, 121: 105138.
- [6] JIMÉNEZ-BARRIOS P, JAÉN-CANO C M, MALUMBRES R, et al. Thermal stability of bovine lactoferrin prepared by cation exchange chromatography and its blends with authorized additives for infant formulas [J]. Food Science and Technology, 2022, 154: 112744.
- [7] SUI Q, ROGINSKI H, WILLIAMS R P W, et al. Effect of pulsed electric field and thermal treatment on the physicochemical and functional properties of whey protein isolate [J]. International Dairy Journal, 2011, 21(4): 206-213.
- [8] SHARMA N, SHARMA R, RAJPUT Y S, et al. Separation methods for milk proteins on polyacrylamide

- gel electrophoresis: critical analysis and options for better resolution [J]. *International Dairy Journal*, 2021, 114: 104920.
- [9] XIONG L, BOEREN S, VERVOORT J, et al. Effect of milk serum proteins on aggregation, bacteriostatic activity and digestion of lactoferrin after heat treatment [J]. *Food Chemistry*, 2021, 337: 127973.
- [10] 贾宏信, 苏米亚, 陈文亮, 等. SDS-PAGE测定乳基婴幼儿配方食品中乳清蛋白方法的研究 [J]. *食品工业*, 2015, 36(10): 264-267.
- [11] KONG Y Y, LIU M, DI W, et al. Purification and identification of lactoferrin from bovine milk [J]. *Advanced Materials Research*, 2012, 1792(524-527): 2290-2293.
- [12] BRISSON G, BRITTEN M, POULIOT Y. Heat-induced aggregation of bovine lactoferrin at neutral pH: effect of iron saturation [J]. *International Dairy Journal*, 2007, 17(6): 617-624.
- [13] 李珊珊, 王加启, 魏宏阳, 等. 凝胶成像系统SDS-PAGE法测定乳及乳制品中乳铁蛋白 [J]. *农业工程学报*, 2008, 24(S2): 283-288.
- [14] 邢志恩, 王军, 戴蕴青, 等. SDS-PAGE-薄层扫描联用法测定3种不同来源的乳铁蛋白 [J]. *食品科学*, 2011, 32(16): 274-278.
- [15] SIGMA-ALDRICH. Chromeo™ P503 [DB/OL]. (2023-02-28) [2023-10-17]. <https://www.sigmaaldrich.cn/CN/zh/product/sigma/30693>.
- [16] BOKKHIM H, TRAN T, BANSAL N, et al. Evaluation of different methods for determination of the iron saturation level in bovine lactoferrin [J]. *Food Chemistry*, 2014, 152: 121-127.
- [17] MAJKA G, SPIEWAK K, KURPIEWSKA K, et al. A high-throughput method for the quantification of iron saturation in lactoferrin preparations [J]. *Analytical and Bioanalytical Chemistry*, 2013, 405(15): 5191-5200.
- [18] 王彩云, 罗述博, 闫序东, 等. 乳铁蛋白铁饱和度检测方法的对比 [J]. *中国乳品工业*, 2015, 43(2): 54-56, 64.
- [19] BOKKHIM H, BANSAL N, GRONDAHL L, et al. Physico-chemical properties of different forms of bovine lactoferrin [J]. *Food Chemistry*, 2013, 141(3): 3007-3013.
- [20] 杨晋辉, 李松励, 郑楠, 等. 热处理对牛乳成分的影响以及热敏感指标的变化研究进展 [J]. *食品科学*, 2017, 38(7): 302-308.
- [21] 仲秋冬, 邵舒彦, 胡静, 等. 热处理与非热处理对牛乳中活性物质影响的研究进展 [J]. *中国乳业*, 2022(1): 94-98.
- [22] 王象欣, 张秋梅, 魏雪冬, 等. 不同类型热处理方式对牛乳品质的影响 [J]. *中国乳品工业*, 2019, 47(4): 20-23.