ФЕДЕРАЛЬНОЕ АГЕНТСТВО

ПО ТЕХНИЧЕСКОМУ РЕГУЛИРОВАНИЮ И МЕТРОЛОГИИ

НАЦИОНАЛЬНЫЙ СТАНДАРТ РОССИЙСКОЙ ФЕДЕРАЦИИ

ГОСТ Р 53761— 2009

МОЛОКО

Идентификация белкового состава электрофоретическим методом в полиакриламидном геле

Издание официальное

БЗ 12—2009/1016

Москва
Стандартинформ
2010

gost.e-ecolog.ru

Предисловие

Цели и принципы стандартизации в Российской Федерации установлены Федеральным законом от 27 декабря 2002 г. № 184-ФЗ «О техническом регулировании», а правила применения национальных стандартов Российской Федерации — ГОСТ Р 1.0—2004 «Стандартизация в Российской Федерации. Основные положения»

Сведения о стандарте

1 РАЗРАБОТАН Государственным учреждением Ярославской области «Ярославский государственный институт качества сырья и пищевых продуктов» (ГУ ЯО «ЯГИКСПП»)

2 ВНЕСЕН Техническим комитетом по стандартизации ТК 470 «Молоко и продукты переработки молока»

3 УТВЕРЖДЕН И ВВЕДЕН в действие Приказом Федерального агентства по техническому регулированию и метрологии от 15 декабря 2009 г. № 1271-ст

4 ВВЕДЕН ВПЕРВЫЕ

Информация об изменениях к настоящему стандарту публикуется в ежегодно издаваемом информационном указателе «Национальные стандарты», а текст изменений и поправок — в ежемесячно издаваемых информационных указателях «Национальные стандарты». В случае пересмотра (замены) или отмены настоящего стандарта соответствующее уведомление будет опубликовано в ежемесячно издаваемом информационном указателе «Национальные стандарты». Соответствующая информация, уведомление и тексты размещаются также в информационной системе общего пользования — на официальном сайте Федерального агентства по техническому регулированию и метрологии в сети Интернет

© Стандартинформ, 2010

Настоящий стандарт не может быть полностью или частично воспроизведен, тиражирован и распространен в качестве официального издания без разрешения Федерального агентства по техническому регулированию и метрологии

Содержание

1 Область применения 1
2 Нормативные ссылки 1
3 Термины и определения 2
4 Сущность метода 2
5 Средства измерения, вспомогательное оборудование, материалы, посуда и реактивы 2
6 Отбор проб для анализа 4
7 Подготовка к проведению анализа 4
8 Условия проведения анализа 6
9 Проведение анализа 6
10 Интерпретация результатов анализа 7
11 Требования, обеспечивающие безопасность 8
Приложение А (справочное) Причины отклонения от стандартного хода анализа и способы их устранения 9
Библиография 11

НАЦИОНАЛЬНЫЙ СТАНДАРТ РОССИЙСКОЙ ФЕДЕРАЦИИ

МОЛОКО

Идентификация белкового состава электрофоретическим методом в полиакриламидном геле

Milk. Identification of protein composition by use of electrophoresis in polyacrilamide gel

Дата введения — 2011—01—01

1 Область применения

Настоящий стандарт распространяется на сырое молоко и устанавливает метод идентификации в его составе белков молочного и немолочного происхождения с использованием электрофореза в полиакриламидном геле.

2 Нормативные ссылки

В настоящем стандарте использованы нормативные ссылки на следующие стандарты:

ГОСТ Р 51652 — 2000 Спирт этиловый ректификованный из пищевого сырья. Технические условия

ГОСТ Р 52054 — 2003 Молоко коровье сырое. Технические условия

ГОСТ Р 52349 — 2005 Продукты пищевые. Продукты пищевые функциональные. Термины и определения

ГОСТ Р 52738 — 2007 Молоко и продукты переработки молока. Термины и определения

ГОСТ 12.1.004 — 91 Система стандартов безопасности труда. Пожарная безопасность. Общие требования

ГОСТ 12.1.005 — 88 Система стандартов безопасности труда. Общие санитарно-гигиенические требования к воздуху рабочей зоны

ГОСТ 12.1.007 — 76 Система стандартов безопасности труда. Вредные вещества. Классификация и общие требования безопасности

ГОСТ 12.1.019 — 2009 Система стандартов безопасности труда. Электробезопасность. Общие требования и номенклатура видов защиты

ГОСТ 12.4.009 — 83 Система стандартов безопасности труда. Пожарная техника для защиты объектов. Основные виды. Размещение и обслуживание

ГОСТ 61 — 75 Реактивы. Кислота уксусная. Технические условия

ГОСТ 450 — 77 Кальций хлористый технический. Технические условия

ГОСТ 1770 — 74 (ИСО 1042—83, ИСО 4788—80) Посуда мерная лабораторная стеклянная. Цилиндры, мензурки, колбы, пробирки. Общие технические условия

ГОСТ 2603 — 79 Реактивы. Ацетон. Технические условия

ГОСТ 3118 — 77 Реактивы. Кислота соляная. Технические условия

ГОСТ 3769 — 78 Реактивы. Аммоний сернокислый. Технические условия

ГОСТ 5860 — 75 Реактивы. Кислота аминоуксусная. Технические условия

ГОСТ 5867 — 96 Молоко и молочные продукты. Методы определения жира

ГОСТ 6259 — 75 Реактивы. Глицерин. Технические условия

ГОСТ 6691 — 77 Реактивы. Карбамид. Технические условия

ГОСТ 6709 — 72 Вода дистиллированная. Технические условия

ГОСТ 7730 — 89 Пленка целлюлозная. Технические условия

Издание официальное

ГОСТ 12026 — 76 Бумага фильтровальная лабораторная. Технические условия

ГОСТ 13928 — 84 Молоко и сливки заготовляемые. Правила приемки, методы отбора проб и подготовка их к анализу

ГОСТ 14919 — 83 Электроплиты, электроплитки и жарочные электрошкафы бытовые. Общие технические условия

ГОСТ 16317 — 87 Приборы холодильные электрические бытовые. Общие технические условия

ГОСТ 20478 — 75 Реактивы. Аммоний надсернокислый. Технические условия

ГОСТ 23932 — 90 Посуда и оборудование лабораторные стеклянные. Общие технические условия

ГОСТ 24104 — 2001 Весы лабораторные. Общие технические требования

ГОСТ 25336 — 82 Посуда и оборудование лабораторные стеклянные. Типы, основные параметры и размеры

ГОСТ 26809 — 86 Молоко и молочные продукты. Правила приемки, методы отбора и подготовка проб к анализу

ГОСТ 27752 — 88 Часы электронно-механические кварцевые настольные, настенные и часы-будильники. Общие технические условия.

ГОСТ 28498 — 90 Термометры жидкостные стеклянные. Общие технические требования. Методы испытаний

ГОСТ 29227 — 91 Посуда лабораторная стеклянная. Пипетки градуированные. Часть 1. Общие требования

Примечание — При пользовании настоящим стандартом целесообразно проверить действие ссылочных стандартов в информационной системе общего пользования — на официальном сайте Федерального агентства по техническому регулированию и метрологии в сети Интернет или по ежегодно издаваемому информационному указателю «Национальные стандарты», который опубликован по состоянию на 1 января текущего года, и по соответствующим ежемесячно издаваемым информационным указателям, опубликованным в текущем году. Если ссылочный стандарт заменен (изменен), то при пользовании настоящим стандартом следует руководствоваться заменяющим (измененным) стандартом. Если ссылочный стандарт отменен без замены, то положение, в котором дана ссылка на него, применяется в части, не затрагивающей эту ссылку.

3 Термины и определения

В настоящем стандарте применены термины, установленные нормативными правовыми актами Российской Федерации [1], ГОСТ Р 52349, ГОСТ Р 52738.

4 Сущность метода

Электрофорез — метод разделения веществ, основанный на явлении миграции заряженных молекул под действием внешнего электрического поля.

Находящиеся в буферном растворе (ПААГ геле) макромолекулы белков обладают некоторым суммарным электрическим зарядом, величина и знак которого зависят от pH среды. При пропускании электрического тока вдоль геля, устанавливается определенный градиент напряжения, т. е. формируется электрическое поле. Под действием этого поля макромолекулы белков в соответствии со своим зарядом мигрируют в направлении катода или анода. Исследуемая проба, состоящая из различных молекул, разделяется на зоны молекул с одинаковой молекулярной массой и зарядом, мигрирующих с одной и той же скоростью. Со временем эти зоны распределяются по длине геля в виде полос и закрепляются.

5 Средства измерения, вспомогательное оборудование, материалы, посуда и реактивы

Ячейка для вертикального электрофореза со следующими параметрами:

- общие размеры ячейки 260 × 190 × 300 мм;
- центральный термостатируемый резервуар и адаптер для трубок, изготовленные из формованного полимера;
- нижняя электродная камера и крышка, изготовленные из формованного поликарбоната;
- зажимы, подставка для заливки и эксцентрики, изготовленные из остеклованного и армированного тефлоном поликарбоната;

- электроды, изготовленные из платиновой проволоки диаметром 0,254 мм;
- пластины стеклянные размером: внутренний — 200 × 200 мм и внешний — 200 × 225 мм;
- предельное значение напряжения 1000 В.

Источник напряжения с диапазоном регулируемого напряжения (20—5000) В, силой тока (0,01—500) мА и мощностью (0,1—400) Вт.

Компьютер с характеристиками не ниже: /Celeron 600/250 mb/HDD 4Gb/CD-ROM/ видеокарта 4 Mb.

Монитор цветной с минимальными требованиями: разрешение экрана 1024×768, качество цветопередачи 16-бит.

Фотоаппарат цифровой с минимальными требованиями: разрешающая способность 1024×768, матрица — 1,3 млн. пикселей.

Анализатор потенциометрический с диапазоном измерения (0—12) ед. pH, с ценой деления 0,1 ед. pH.

Весы лабораторные 1-го класса точности (специальные) по ГОСТ 24104 с пределами абсолютной погрешности однократного взвешивания ± 0,0003 г.

Термометр лабораторный шкальный от 0 °С до 100 °С с ценой деления 1°С по ГОСТ 28498.

Аппарат для встряхивания типа «Вортекс» (скорость вращения 250—3000 об/мин).

Термостат твердотельный типа «Гном» под пробирки типа «Эппендорф» вместимостью 1,5 $см^3$ с диапазоном рабочих температур от окружающей до 99 °С.

Холодильник бытовой электрический любого типа, обеспечивающий поддержание температуры в холодильной камере (4 ± 2) °С по ГОСТ 16317.

Плитка электрическая бытовая с регулируемым обогревом любого типа по ГОСТ 14919.

Электросепаратор бытовой, обеспечивающий получение обезжиренного молока с массовой долей жира не более 0,05 %.

Часы 2-го класса точности по ГОСТ 27752.

Вода дистиллированная по ГОСТ 6709.

Центрифуга лабораторная с частотой вращения не менее 5000 об/мин.

Микроцентрифуга настольная типа «Эппендорф» (частота вращения не менее 13000 об/мин).

Мешалка магнитная с регулируемым электрообогревом любого типа.

Баня водяная, обеспечивающая нагрев до температуры 50 °С.

Пипетдозаторы одноканальные переменного объема:
- рабочий объем 0,002—0,02 $см^3$, шаг переменного объема 0,001 $см^3$;
- рабочий объем 0,02—0,2 $см^3$, шаг переменного объема 0,01 $см^3$;
- рабочий объем 0,2—1 $см^3$, шаг переменного объема 0,1 $см^3$.

Бумага фильтровальная лабораторная по ГОСТ 12026.

Пленка целлюлозная по ГОСТ 7730.

Воронка В-75-80 ХС по ГОСТ 25336.

Колбы исполнения 2-50-2, 2-100-2, 2-500-2, 2-1000-2 по ГОСТ 1770.

Колбы исполнения 1-100, Кн-1-50-14/23 ХС, Кн-1-100-29/32 ХС, Кн-1-250-24/29 ХС, Кн-1-500-29/32 ХС, Кн-1-2000-29/32 ХС по ГОСТ 25336.

Цилиндры исполнения 1-50-2, 1-100-2, 1-1000-2 по ГОСТ 1770.

Эксикатор по ГОСТ 23932.

Пипетка исполнения1-1-2-10, 1-1-2-25 по ГОСТ 29227.

Насос водоструйный по ГОСТ 25336.

Микрошприц вместимостью 0,05 $см^3$.

Пробирки микроцентрифужные типа «Эппендорф» вместимостью 1,5 $см^3$.

Стакан исполнения В-1-50 ХС, В-1-100 ХС, В-1-250 ХС по ГОСТ 25336.

Наконечники для дозаторов с переменным объемом 0,02, 0,2 и 1 $см^3$.

Акриламид (массовая доля основного вещества не менее 99,9 %).

N', N' — Метиленбисакриламид, для электрофореза.

Трис-(гидроксиметил)-аминометан (массовая доля основного вещества не менее 99,8 %).

Карбамид, ч. д. а., по ГОСТ 6691.

Кумасси бриллиантовый голубой G-250, для электрофореза.

Кислота аминоуксусная, х. ч., по ГОСТ 5860.

Бромфеноловый синий, для электрофореза.

Аммоний надсернокислый, х. ч., по ГОСТ 20478.

N, N, N', N' — Тетраметилэтилендиамин (ТЕМЕД), для электрофореза.

Ацетон, х. ч., по ГОСТ 2603.
Глицерин, ч. д. а., по ГОСТ 6259.
Эфир диэтиловый, ч. д. а., по [2].
Кислота соляная, х. ч., по ГОСТ 3118.
Аммоний сернокислый, х. ч., по ГОСТ 3769.
Спирт этиловый по ГОСТ Р 51652.
Кислота уксусная ледяная, х. ч., по ГОСТ 61.
Кальций хлористый безводный по ГОСТ 450.
Вода дистиллированная по ГОСТ 6709.

Допускается применять другие средства измерений, вспомогательные устройства и реактивы с метрологическими или техническими характеристиками не хуже указанных.

6 Отбор проб для анализа

Основные понятия и общие правила отбора проб — по ГОСТ 13928 и ГОСТ 26809.

Пробы транспортируют при температуре от 2 °С до 8 °С не более 12 ч.

В случае, если анализ не может быть проведен сразу, пробы рекомендуется хранить в холодильнике при температуре (4 ± 2) °С не более 24 ч.

Не допускается консервирование проб.

7 Подготовка к проведению анализа

7.1 Приготовление растворов

7.1.1 Раствор соляной кислоты молярной концентрацией 1 моль/дм^3

В мерную колбу вместимостью 1000 см^3 вносят около 500 см^3 дистиллированной воды и 90 см^3 концентрированной соляной кислоты плотностью 1,174 г/см^3 (или 85 см^3 концентрированной соляной кислоты плотностью 1,188 г/см^3), аккуратно перемешивают и доводят полученный объем дистиллированной водой до метки.

Срок хранения раствора — 3 мес.

7.1.2 Раствор карбамида молярной концентрацией 6 моль/дм^3

В химическом стакане вместимостью 50 см^3 растворяют (18,02 ± 0,01) г карбамида в 30 см^3 дистиллированной воды, переливают в мерную колбу вместимостью 50 см^3 и доводят полученный объем дистиллированной водой до метки.

Срок хранения раствора при температуре (4 ± 2) °С — 1 мес.

7.1.3 Раствор лидирующего красителя

В микроцентрифужную пробирку типа «Эппендорф» вместимостью 1,5 см^3 помещают (0,0040 ± 0,0003) г бромфенолового синего, добавляют 1 см^3 дистиллированной воды и перемешивают на аппарате для встряхивания типа «Вортекс» (до полного растворения красителя).

Срок хранения раствора при температуре (4 ± 2) °С — 1 мес.

7.1.4 Раствор трис- HCl

В химическом стакане вместимостью 100 см^3 растворяют (6,070 ± 0,001) г трис- (гидрооксиметил) аминометана в 50 см^3 дистиллированной воды, доводят раствором соляной кислоты молярной концентрацией 1 моль/дм^3 до (8,8 ± 0,1) ед. pH, переливают в мерную колбу вместимостью 100 см^3 и доводят до метки.

Срок хранения раствора в стеклянной колбе с притертой пробкой при температуре (4 ± 2) °С — 1 мес.

7.1.5 Раствор мономеров полиакриламидного геля

В коническую колбу вместимостью 50 см^3 вносят (3,1040 ± 0,0003) г акриламида, (0,0960 ± 0,0003) г N', N' — метиленбисакриламида, (3,1040 ± 0,0003) г карбамида, добавляют 8,75 см^3 раствора трис — HCl, приготовленного по 7.1.4 и 26 см^3 дистиллированной воды. Перемешивают на магнитной мешалке с электроподогревом при температуре (50 ± 5) °С в течение 30 мин и охлаждают до комнатной температуры.

Срок хранения раствора в стеклянной колбе с притертой пробкой при температуре (4 ± 2) °С — 1 мес.

Примечание — Количество раствора для полиакриламидного геля дано для одного анализа и получения геля размером (160 × 160 × 1) мм.

7.1.6 Раствор электродного буфера

В мерную колбу вместимостью 500 см^3 вносят (4,50 ± 0,01) г трис-(гидрооксиметил) аминометана, (21,60 ± 0,01) г аминоуксусной кислоты и растворяют в 300 см^3 дистиллированной воды, полученный объем доводят до метки, переливают в коническую колбу вместимостью 2000 см^3 и добавляют 1000 см^3 дистиллированной воды.

Срок хранения раствора в стеклянной колбе с притертой пробкой при температуре (4 ± 2) °С — 1 мес.

Примечание — Количество электродного буфера одного анализа дано для одной электрофоретической ячейки с параметрами, указанными в разделе 5. При использовании электрофоретической ячейки другого типа количество электродного буфера должно быть соответственно скорректировано.

7.1.7 Раствор для окрашивания геля

В коническую колбу вместимостью 500 см^3 вносят (0,50 ± 0,01) г кумасси бриллиантового голубого, добавляют 200 см^3 этилового спирта, 50 см^3 кислоты уксусной ледяной и 250 см^3 дистиллированной воды. Содержимое колбы тщательно перемешивают.

Срок хранения раствора в стеклянной колбе с притертой пробкой при температуре (4 ± 2) °С — 1 мес.

7.2 Подготовка контрольных проб

Для приготовления контрольных проб используют сырое молоко по ГОСТ Р 52054 и [1] с кислотностью (16,0—20,0) °Т без содержания консервантов и ингибирующих веществ.

7.2.1 Отделение жира

7.2.1.1 Метод сепарирования

(0,4—0,5) дм^3 молока перед сепарированием подогревают на водяной бане до температуры (40—45) °С.

Через 1—2 мин после включения электропривода сепаратора для прогрева молочного тракта через электросепаратор пропускают 1 дм^3 дистиллированной воды, нагретой до температуры (40—50) °С. Далее, не выключая электропривод сепаратора, заливают предварительно подогретое молоко и сепарируют. После сепарирования обезжиренное молоко используют для дальнейшего анализа.

7.2.1.2 Метод центрифугирования

(0,4—0,5) дм^3 молока помещают в центрифужные пробирки или стаканы и центрифугируют при 5000 об/мин в течение (20—30) мин. После центрифугирования центрифужные пробирки (стаканы) помещают в холодильник и охлаждают при температуре (4 ± 2) °С. После полного охлаждения застывший верхний жировой слой удаляют, а оставшееся обезжиренное молоко используют для дальнейшего анализа.

7.2.2 Выделение белков

В химический стакан вместимостью 250 см^3 вносят 50 см^3 предварительно обезжиренного молока (с массовой долей жира не более 0,05 % по ГОСТ 5867—90), нагревают на водяной бане до температуры (35—40) °С и осаждают казеин, прибавляя по каплям раствор соляной кислоты, приготовленный по 7.1.1. Осадку дают отстояться, сыворотку осторожно сливают. Осадок промывают, добавляя 50 см^3 дистиллированной воды, перемешивают, дают отстояться и сливают воду. Промывку проводят не менее пяти раз.

К отмытому осадку добавляют 30 см^3 ацетона и оставляют на 30 мин, затем ацетон осторожно сливают. Действие повторяют до полного удаления жира, но не менее пяти раз. Осадок фильтруют через сухой складчатый фильтр и переносят в коническую колбу вместимостью 250 см^3, заливают 120 см^3 диэтилового эфира и закрывают притертой пробкой. Перемешивают не менее 5 мин и оставляют на 12 ч в холодильнике. Через 12 ч осадок фильтруют через сухой складчатый фильтр и подсушивают на воздухе в вытяжном шкафу не менее 1 часа.

(10,0 ± 0,1) г подсушенной пробы переносят в коническую колбу вместимостью 100 см^3, добавляют 60 см^3 раствора карбамида, приготовленного по 7.1.2, перемешивают на магнитной мешалке при температуре (50 ± 5) °С до полного растворения белка. Получившийся раствор переносят в мешочек для диализа, изготовленный из целлофановой пленки, который погружают в дистиллированную воду и помещают в холодильник. Диализ (освобождение раствора от низкомолекулярных соединений) проводят не менее 24 ч при периодической смене дистиллированной воды. После чего образовавшийся осадок фильтруют через сухой складчатый фильтр и высушивают в эксикаторе над безводным хлористым кальцием не менее 4 часов.

Срок хранения выделенного казеина при температуре (4 ± 2) °С — не более 2-х недель.

Сыворотку, оставшуюся после выделения казеина, сливают в коническую колбу вместимостью 250 см^3 и добавляют аммоний сернокислый (на 25 см^3 сыворотки (17,5 ± 0,1) г аммония сернокислого), и тщательно перемешивают до полного растворения. Помещают в холодильник при температуре (4 ± 2) °С на 12 ч. Отделившийся белок фильтруют через сухой складчатый фильтр и переносят в мешочек для диализа, изготовленный из целлофановой пленки, который погружают в дистиллированную воду и помещают в холодильник. Диализ проводят не менее 24 ч при периодической смене дистиллированной воды. Через 24 ч

образовавшийся осадок фильтруют через сухой складчатый фильтр и высушивают в эксикаторе над безводным хлористым кальцием не менее 4 ч.

Срок хранения сывороточных белков при температуре (4 ± 2) °С — не более 2-х недель.

7.3 Подготовка исследуемых проб молока

Отделение жира и выделение белков исследуемых проб молока осуществляется по 7.2.1 и 7.2.2.

7.4 Приготовление растворов белков

7.4.1 Приготовление контрольных растворов белков

В микроцентрифужную пробирку типа «Эппендорф» вместимостью 1,5 $см^3$ помещают (0,0040 ± 0,0003) г белка, выделенного по 7.2, 7.3, добавляют 0,5 $см^3$ раствора карбамида, приготовленного по 7.1.2, выдерживают в термостате при температуре 95 °С в течение 5 мин, тщательно перемешивают на аппарате для встряхивания типа «Вортекс» до полного растворения белков. К полученному раствору добавляют 0,2 $см^3$ глицерина и 0,025 $см^3$ лидирующего красителя, приготовленного по 7.1.3, тщательно перемешивают на аппарате для встряхивания типа «Вортекс», центрифугируют при частоте 3000 об/мин в течение 5 мин, образовавшийся осадок отбрасывают, а надосадочную жидкость используют для анализа.

Срок хранения растворов белков при температуре (4 ± 2) °С — не более семи суток.

7.4.2 Приготовление исследуемых растворов белков

Приготовление исследуемых растворов белков осуществляется по 7.4.1.

8 Условия проведения анализа

При выполнении анализа должны соблюдаться следующие условия:

- температура окружающего воздуха . . . . . (20 ± 5) °С
- относительная влажность воздуха . . . . . от 30 % до 80 %
- атмосферное давление . . . . . от 84 до 106 кПа
- напряжение в сети . . . . . (220 ± 10) В
- частота переменного тока . . . . . (50 ± 2) Гц

9 Проведение анализа

При сборке камеры для полимеризации геля используют стеклянные пластины размером: внутренняя — (200 × 200) мм и внешняя — (200 × 225) мм.

На внешнюю пластину справа и слева вдоль длинных сторон помещают спейсеры (пластинки) толщиной 1 мм. Поверх спейсеров накладывают внутреннюю стеклянную пластину. Пластины фиксируют зажимами справа и слева и устанавливают на подставку для заливки с желобом для выравнивания. Камеру проверяют на герметичность с помощью дистиллированной воды, которую затем удаляют. После проверки камеры на герметичность между пластинами камеры под небольшим углом помещают гребенку для формирования лунок.

Для обеспечения нормального процесса полимеризации геля раствор мономеров, приготовленный по 7.1.5, подвергают деаэрации в колбе с тубусом, присоединенной к водоструйному насосу. После деаэрации в раствор добавляют (0,0180 ± 0,0003) г аммония надсернокислого и 0,018 $см^3$ N, N, N', N'-тетраметилэтилендиамина, осторожно перемешивают для предотвращения образования пузырей в растворе. Стеклянной пипеткой с грушей вдоль края спейсера (с приподнятой стороны гребенки) раствор вносят в камеру для полимеризации.

Гель полимеризуется в течение 45 мин, после чего гребенку извлекают и ополаскивают образовавшиеся в геле лунки дистиллированной водой.

Камеру с гелем прикрепляют к термостатируемой части и помещают в электрофоретическую ячейку.

В электродные камеры ячейки заливают электродный буфер, приготовленный по 7.1.6.

В лунки геля под электродный буфер с помощью микрошприца вносят контрольные и исследуемые растворы белков, приготовленные по 7.4. Крайние лунки геля рекомендуется использовать для контрольных растворов белков. Количество раствора, вносимого в одну лунку, составляет (0,020—0,025) $см^3$. После каждого внесения микрошприц тщательно промывают раствором электродного буфера.

Для получения достоверных результатов рекомендуется каждый исследуемый раствор белка вносить не менее чем в трех повторностях.

После внесения контрольных и исследуемых растворов электрофоретическую ячейку закрывают крышкой.

Электрофорез проводят в течении (4—5) ч в режиме постоянного напряжения (120—130) В.

Примечание — Режим указан для электрофоретической ячейки с параметрами, указанными в 5, и полиакриламидного геля размером (160 × 160 × 1) мм. При использовании ячейки другого типа или геля с другими размерами режим проведения электрофореза подбирается индивидуально.

Для предотвращения неравномерного распределения тепла и искажения белковых зон (полос) рекомендуется обеспечить принудительное охлаждение термостатируемого резервуара.

Электрофорез считают законченным, когда лидирующий краситель опустится до нижнего края геля.

После проведения электрофореза гель аккуратно извлекают из электрофоретической ячейки, фиксируют и окрашивают. Фиксация и окраска осуществляются одновременно в растворе, приготовленном в соответствии с 7.1.7, в течение 2 ч. Для ускорения процесса допускается проводить окрашивание и фиксацию геля в течение одного часа на электроплитке при (40 ± 5) °С, а ванночку с раствором и гелем необходимо регулярно покачивать.

Отмывку окрашенного геля производят кипячением в 10 %-ном растворе уксусной кислоты до полного удаления фона с постоянной сменой отмывающего раствора по мере вымывания краски.

В приложении А приведены возможные причины отклонения от стандартного хода анализа и предложены способы их устранения.

Визуализацию разделения белков после электрофореза осуществляют с помощью фотоаппарата. Полученные электрофореграммы сохраняют на жестком магнитном носителе компьютера.

10 Интерпретация результатов анализа

Идентификацию белков молочного и немолочного происхождения осуществляют визуально.

Совпадение белковых фракций (полос) на электрофореграмме контрольного и исследуемых растворов (не менее чем в трех повторностях) указывает на отсутствие в составе продукта белков немолочного происхождения (рисунок 1).

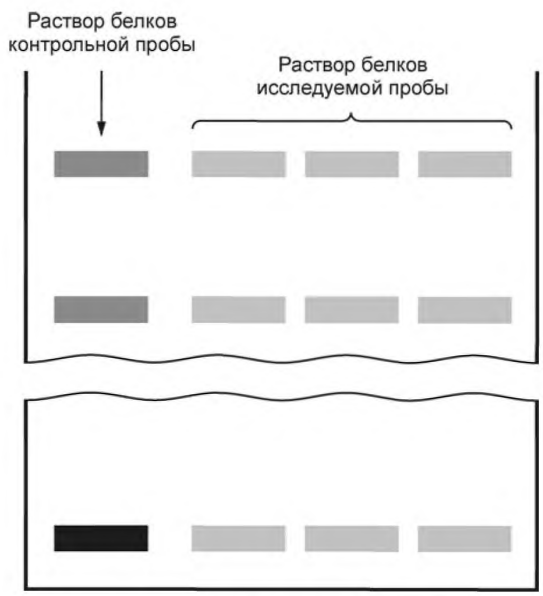


Рисунок 1 — Электрофореграмма раствора белков исследуемой пробы, в составе которой отсутствуют белки немолочного происхождения

При наличии в исследуемой пробе белков немолочного происхождения на электрофореграмме присутствуют дополнительные белковые фракции (полосы), которые не наблюдаются в контрольных пробах (рисунок 2).

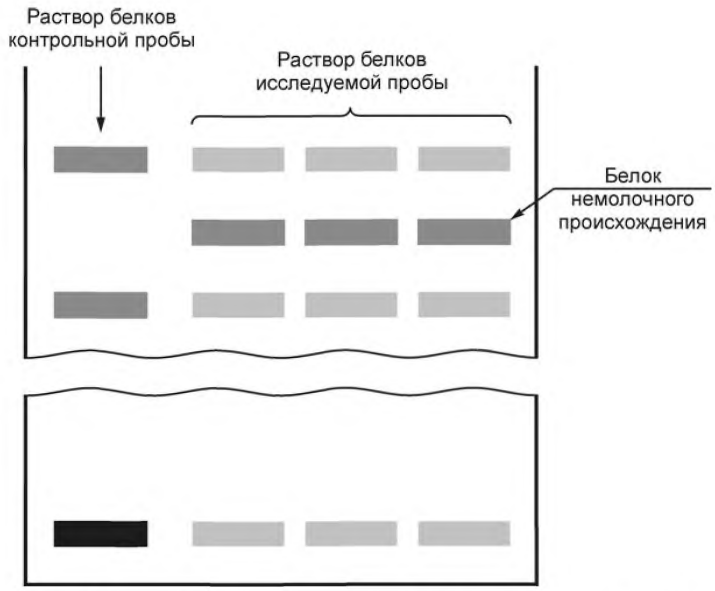


Рисунок 2 — Электрофореграмма раствора белков исследуемой пробы, в составе которой присутствует белок немолочного происхождения

В случае возникновения сомнений о наличии в исследуемой пробе белков немолочного происхождения (слабое изображение отдельных фракций) рекомендуется увеличить концентрацию белков в пробе и повторить анализ.

11 Требования, обеспечивающие безопасность

При проведении электрофоретического анализа необходимо соблюдать требования техники безопасности при работе с химическими реактивами по ГОСТ 12.1.007, требования электробезопасности при работе с электроустановками по ГОСТ 12.1.019, а также требования, изложенные в технической документации и инструкции по эксплуатации ячейки для электрофореза.

Помещение должно соответствовать требованиям пожаробезопасности по ГОСТ 12.1.004 и иметь средства пожаротушения по ГОСТ 12.4.009. Содержание вредных веществ в воздухе рабочей зоны не должно превышать допустимых значений по ГОСТ 12.1.005.

При работе с нейротоксинами следует соблюдать особую осторожность, все манипуляции обязательно проводить в резиновых перчатках и только в вытяжном шкафу.

К выполнению анализа и обработке результатов допускают специалиста, имеющего высшее или среднее специальное биохимическое образование, или опыт работы в биохимической лаборатории, прошедшего соответствующий инструктаж и освоившего метод в процессе обучения.

Приложение А
(справочное)

Причины отклонения от стандартного хода анализа и способы их устранения

Таблица А.1

Отклонение	Возможные причины	Способы устранения
1 Полосы по краям геля расположены выше, чем в центре	Центральная часть геля нагревается сильнее краев Избыточное напряжение	Центральный резервуар заполнить охлаждающим раствором Охлаждающий раствор прокачивать при температуре (10—15) °С; уменьшить напряжение
2 Диффузия лидирующего красителя	Распад раствора белков пробы и/или растворов буферов Диффузия	Приготовить растворы из свежих реактивов Если полосы белка имеют такой же диффузный характер, как и полоса лидирующего красителя, увеличить: силу тока на (25—50) %
3 Вертикальная исчерченность трека	Избыточная концентрация белков в пробе	Уменьшить концентрацию белков в пробе; уменьшить напряжение на 25 %
4 Горизонтальная исчерченность трека	Неполное растворение белков	Полностью растворить пробу; центрифугировать
5 Широкие или размытые полосы или пятна белков	Диффузия в связи с медленной миграцией Химические модификации ионными загрязнениями Неполное обезжиривание пробы	Увеличить силу тока на 20 % Деионизовать раствор карбомида Полностью удалить жир
6 Размывание полос в латеральном направлении	Диффузия растворов белков за пределы лунок до включения напряжения	Уменьшить время между внесением пробы и подачей напряжения
7 Искривленные полосы	Недостаточная полимеризация геля вокруг лунок Наличие солей в пробе Неровная поверхность геля	Дегазировать раствор мономеров геля; увеличить концентрации аммония надсернокислого и N, N, N', N'-тетраметилэтилендиамина на 25 % Удалить соли диализом Проверить стадию взятия проб для приготовления геля, при необходимости заменить реактивы
8 Электрофорез занимает более 5 ч	Высокая концентрация электродного буфера Низкое напряжение	Проверить стадию приготовления электродного буфера (при необходимости разбавить буфер), проверить качество дистиллированной воды, заменить реактивы Увеличить напряжение на (25—50) %
9 Электрофорез идет слишком быстро с плохим разрешением	Буфер слишком разбавлен Слишком высокое напряжение	Проверить стадию приготовления электродного буфера, проверить качество дистиллированной воды, заменить реактивы Уменьшить напряжение на (25—50) %

Окончание таблицы А.1

Отклонение	Возможные причины	Способы устранения
10 Наблюдается несовпадение полос в контрольных пробах	Часть белка могла окислиться во время электрофореза или не была полностью восстановлена на стадии подготовки пробы	Приготовить свежие контрольные пробы; заменить реактивы

Библиография

[1] Федеральный закон Российской Федерации от 12 июня 2008 г. № 88-ФЗ «Технический регламент на молоко и молочную продукцию»

[2] ТУ 2600-001-43852015-05 Эфир диэтиловый

УДК 637.12.04/07:576.8:006.354 ОКС 67.100.10 Н19 ОКСТУ 9209

Ключевые слова: сырое молоко, белок, идентификация белкового состава, электрофорез, полиакриламидный гель, электрофореграмма, интерпретация результатов анализа

Редактор *М. Е. Никулина*
Технический редактор *Н. С. Гришанова*
Корректор *Н. И. Гаврищук*
Компьютерная верстка *А. П. Финогеновой*

Сдано в набор 29.06.2010. Подписано в печать 02.08.2010. Формат $60\times84^1/_8$. Бумага офсетная. Гарнитура Ариал. Печать офсетная. Усл. печ. л. 1,86. Уч.-изд. л. 1,30. Тираж 168 экз. Зак. 1021.

ФГУП «СТАНДАРТИНФОРМ», 123995 Москва, Гранатный пер., 4.
gost.e-ecolog.ru gost.e-ecolog.ru
Набрано и отпечатано в Калужской типографии стандартов, 248021 Калуга, ул. Московская, 256.

gost.e-ecolog.ru