

Nachweis der Tierart in Milch und Milchprodukten mit isoelektrischer Fokussierung

DIN
10469

ICS 67.100.10; 67.100.20

Deskriptoren: Lebensmittelprüfung, Milchuntersuchung, Milchprodukt, Prüfverfahren, Tierart

Detection of the animal species of milk and milk products with isoelectrical focusing

Recherche des species animaux du lait et produits laitiers avec focussion isoélectrique

Vorwort

Diese Norm wurde vom Normenausschuß Lebensmittel und landwirtschaftliche Produkte, Arbeitsausschuß "Chemische und physikalische Milchuntersuchung", bearbeitet. Das der Norm zugrundeliegende Verfahren wurde von der Bundesgesundheitsamt-Arbeitsgruppe "Tierarten – Identifizierung in Milch und Milchprodukten" erarbeitet und in der Amtlichen Sammlung nach § 35 Lebensmittel- und Bedarfsgegenständengesetz (LMBG) als Methode L 01.00-39 veröffentlicht.

1 Anwendungsbereich

Diese Norm legt ein Verfahren zum Nachweis der Tierart von Milch und Milchprodukten mit der isoelektrischen Fokussierung (PAGIF) fest.

2 Normative Verweisungen

Diese Norm enthält durch datierte oder undatierte Verweisungen Festlegungen aus anderen Publikationen. Diese normativen Verweisungen sind an den jeweiligen Stellen im Text zitiert, und die Publikationen sind nachstehend aufgeführt. Bei datierten Verweisungen gehören spätere Änderungen oder Überarbeitungen dieser Publikationen nur zu dieser Norm, falls sie durch Änderung oder Überarbeitung eingearbeitet sind. Bei undatierten Verweisungen gilt die letzte Ausgabe der in Bezug genommenen Publikation.

DIN 10327

Milch und Milchprodukte – Probenahmetechnik

3 Kurzbeschreibung des Verfahrens

Mit Hilfe der isoelektrischen Fokussierung in harnstoffhaltigen Polyacrylamidgelen werden unter Einfluß eines elektrischen Feldes die gelösten und mit Plasmin zur Freisetzung der γ -Caseine behandelten Milchproteine nach ihren unterschiedlichen isoelektrischen Punkten getrennt und fokussiert. Die Auswertung erfolgt durch Vergleich der gefärbten γ -Caseinbanden (Kuhmilchnachweis) zwischen der zu bestimmenden Probe und der im selben Gel behandelten Referenzproben. Zur Differenzierung von Schaf und Ziege in Käse bzw. in Lab-behandelten Milchprodukten erfolgt eine Auswertung der para- χ -Caseinbanden. Die reduzierten β -Laktoglobulinzonen dienen der Tierartenidentifizierung bei Molkenmilchprodukten.

4 Chemikalien

Es sind analysenreine Chemikalien zu verwenden. Das verwendete Wasser muß destilliert oder mindestens von entsprechender Reinheit sein.

4.1 Harnstoffhaltige Polyacrylamidgele für die isoelektrische Fokussierung

ANMERKUNG: Die folgenden Angaben gelten für selbsthergestellte harnstoffhaltige Polyacrylamidgele mit den Maßen 265 mm $\times$ 125 mm $\times$ 0,25 mm. Andere Gelrezepturen oder -abmessungen dürfen verwendet werden, wenn die Trennungsbedingungen gegebenenfalls angepaßt werden.

Achtung: Acrylamide sind neurotoxisch. Deshalb sollte anstelle der Einwaage von 0,15 g Festsubstanz eine im Handel erhältliche Acrylamid-Fertiglösung verwendet werden. Bei einer solchen Lösung mit Massenanteilen von 30 % Acrylamid und 0,8 % N,N'-Methylen-bis-acrylamid (BIS) müssen anstelle der Festeinwaage 16,2 ml für die GelstammLösung eingesetzt werden.

4.1.1 GelstammLösung

a) Zusammensetzung

- 4,85 g Acrylamid;
- 0,15 g N,N'-Methylen-bis-acrylamid (BIS);
- 48,05 g Harnstoff;
- 15,00 g Glycerin ($w = 87\%$)¹⁾;
- 2,00 g Mischbettionenaustauscher mit Farbindikator²⁾.

b) Herstellung

Die Bestandteile bis auf den Mischbettionenaustauscher werden in Wasser gelöst und auf 100 ml aufgefüllt. Anschließend werden der Lösung 2 g Mischbettionenaustauscher zugesetzt und 30 min gerührt. Nach Filtration über 0,45 μ m Membranfilter wird die Lösung in Braunglasflaschen kühl aufbewahrt. Bei entsprechender Lagerung ist die GelstammLösung bis 2 Monate haltbar. Die Leitfähigkeit sollte unter 2,5 μ S liegen.

¹⁾ Massenanteil

²⁾ Über Bezugsquellen gibt Auskunft: DIN-Bezugsquellen für normgerechte Erzeugnisse im DIN Deutsches Institut für Normung e. V., Burggrafenstraße 6, 10787 Berlin, Postanschrift 10772 Berlin.

Fortsetzung Seite 2 bis 9

Normenausschuß Lebensmittel und landwirtschaftliche Produkte (NAL) im DIN Deutsches Institut für Normung e.V.

ANMERKUNG: Falls es zur Auskristallisation von Harnstoff in Gel kommt, sollte die Harnstoffmenge bei der Zusammensetzung auf 40 g reduziert werden und die Glycerinmenge auf 20 g angehoben werden.

4.1.2 Gellösungen

Je nach Anwendungsbereich werden verschiedene Ampholyten und Additive mit der Gelstammlösung nach 4.1.1 gemischt.

ANMERKUNG: Von den im Handel erhältlichen Ampholyten haben sich nur wenige als geeignet erwiesen.

4.1.2.1 Kuhmilchnachweis über γ -Caseine

- 9,0 ml Gelstammlösung,
- 24 mg β -Alanin,
- 250 μ l Ampholyt pH = 5 bis 7²⁾,
- 250 μ l Ampholyt pH = 6 bis 8²⁾,
- 500 μ l Ampholyt pH = 3,5 bis 9,5²⁾.

4.1.2.2 Differenzierung Schaf/Ziege über die para- χ -Caseine

- 9,4 ml Gelstammlösung,
- 300 μ l Ampholyt pH = 3,5 bis 9,5²⁾,
- 300 μ l Ampholyt pH = 7 bis 9²⁾.

4.1.2.3 Tierartennachweis bei Molkeneiweißkäse über die β -Lactoglobuline

- 9,4 ml Gelstammlösung,
- 100 μ l Ampholyt pH = 5 bis 7²⁾,
- 100 μ l Ampholyt pH = 6 bis 8²⁾,
- 250 μ l Ampholyt pH = 2,5 bis 5²⁾,
- 200 μ l Ampholyt pH = 4 bis 6,5²⁾.

Die Gellösung ist zu mischen. Gellösung ist erst unmittelbar vor Gießvorgang nach 4.1.4 anzusetzen.

4.1.3 Katalysatorlösungen

PER: 800 mg Ammoniumpersulfat mit Wasser zu 2 ml lösen.
TEMED: N,N,N',N'-Tetramethylethylendiamin.

Die PER-Lösung ist stets frisch herzustellen.

4.1.4 Herstellung der harnstoffhaltigen Polyacrylamidgele

Auf eine Glasplatte nach 5.1 wird die Gelträgerfolie nach 5.2 mit Hilfe einiger Tropfen Wasser aufgewalzt, wobei ausgetretenes Wasser entfernt wird. In gleicher Weise wird die mit Abstandshaltern (Dicke = 0,25 mm) versehene Gegenfolie nach 5.3 auf eine weitere Glasplatte aufgewalzt.

Diese wird dann auf einem Nivelliertisch horizontal ausgerichtet. Zur vorbereiteten, auf Raumtemperatur gebrachten und für 5 min im Vakuum entgasten Gellösung nach 4.1.2 werden je 10 μ l der Katalysatorlösungen nach 4.1.3 (TEMED und PER) zugeben. Danach wird kurz gemischt und gleichmäßig auf die Mitte der Gegenfolie ausgegossen. Die Gelträgerplatte (Folienseite nach unten zeigend) wird mit einer Kante auf die nivellierte Gegenfolienplatte aufgesetzt und langsam abgesenkt, so daß sich zwischen den Folien ein Flüssigkeitsfilm bildet, welcher sich gleichmäßig und blasenfrei ausbreiten kann (siehe Bild A.3). Die Gelträgerfolien wer-

den mit Hilfe eines dünnen Spatels vollständig aufgesetzt und drei weitere Glasplatten als Andruckgewichte aufgelegt. Nach vollständiger Polymerisierung (etwa 60 min) wird das auf der Gelträgerfolie anpolymerisierte Gel mitsamt Gegenfolie durch Verkanten der Glasplatten herausgelöst. Die Rückseite der Trägerfolie wird sorgfältig von Gelresten und Harnstoff gesäubert. Das "Gelsandwich" wird nun in einen Folienschlauch eingeschweißt und im Kühlschrank aufbewahrt (max. 6 Wochen).

ANMERKUNG: Die Gegenfolie mit den Abstandshaltern darf wiederverwendet werden. Das Polyacrylamidgel darf auf kleinere Abmessungen zurechtgeschnitten werden, dies sollte bei geringer Probenanzahl oder bei Verwendung eines Elektrophoreseautomaten (2 Gele mit den Maßen 4,5 cm x 5 cm) erfolgen.

4.2 Kontaktflüssigkeit

Kerosin oder n-Decan

4.3 Anodenflüssigkeit

5,76 g Phosphorsäure, $w = 85\%$ ¹⁾ mit Wasser auf 100 ml auffüllen.

4.4 Kathodenflüssigkeit

2,00 g Natriumhydroxid in Wasser lösen und auf 100 ml auffüllen.

4.5 Reagenzien zur Proteinisolierung

Dichlormethan; Essigsäure $\sigma = 25\%$ ³⁾; Aceton, über Molekularsieb 0,3 nm getrocknet.

4.6 Protein-Pufferlösung

- 5,75 g Glycerin, $w = 87\%$ ¹⁾,
- 24,03 g Harnstoff

mit destilliertem Wasser lösen und auf 50 ml auffüllen, mit 2 g Mischbettionenaustauscher während 40 min unter Rühren entionisieren und filtrieren, anschließend 250 mg Dithiothreitol (siehe 4.12) zugeben.

Im Kühlschrank lagern, nach 4 Wochen gegebenenfalls neu entionisieren.

4.7 Reagenzien für die enzymatische Probenvorbehandlung

4.7.1 Für die Plasminspaltung

4.7.1.1 Ammoniumcarbonat-Pufferlösung

NH₄HCO₃-Lösung (1,58 g/100 ml Wasser, $c = 0,2$ mol/l⁴⁾) mit (NH₄)₂CO₃-Lösung (1,92 g/100 ml Wasser, $c = 0,2$ mol/l⁴⁾) auf pH = 8,0 titrieren.

4.7.1.2 Plasmin vom Rind (E.C.3.4.21.7) min. 5 U/ml⁵⁾

4.7.1.3 ϵ -Aminocaprinsäurelösung zur Enzymaktivierung, 2,624 g ϵ -Aminocaprinsäure in 100 ml Ethanol, $w = 40\%$ ¹⁾ lösen.

4.7.2 Labspaltung

4.7.2.1 Natriumhydroxydlösung, $c(\text{NaOH}) = 0,5$ mol/l⁴⁾

4.7.2.2 Kälberlab, Labstärke 1 : 10 000 bis 1 : 20 000

¹⁾ Siehe Seite 1

²⁾ Siehe Seite 1

³⁾ Volumenkonzentration

⁴⁾ Stoffmengenkonzentration

⁵⁾ Die Enzymaktivität wird in dieser Norm in Internationalen Einheiten (U) angegeben. 1 U ist die Enzymaktivität, die unter festgelegten Bedingungen eine Substratmenge von 1 μ mol je min umsetzt.

4.8 Fixierlösung

150 g Trichloressigsäure in Wasser lösen und auf 1000 ml auffüllen.

4.9 Entfärbelösung

500 ml Methanol und 200 ml Eisessig mit destilliertem Wasser auf 2000 ml auffüllen.

ANMERKUNG: Entfärbelösung täglich frisch herstellen; sie kann zweckmäßigerweise aus Vorratslösungen (Methanol, $w = 50\%$ bzw. Eisessig, $w = 20\%$)¹⁾ durch Mischen gleicher Volumina zubereitet werden.

4.10 Färbelösung (gebrauchsfertig)

Je 125 ml der Vorratslösungen nach 4.10.1 und 4.10.2 werden unmittelbar vor der Färbung gemischt. Die Färbelösung ist zum einmaligen Gebrauch bestimmt.

4.10.1 Vorratslösung 1

3,0 g Coomassie Brilliant Blau G 250 (C.I.42655)⁶⁾ in 1000 ml Methanol, $w = 90\%$ ¹⁾ unter Einsatz eines Magnetrührers lösen (etwa 45 min), durch Faltenfilter filtrieren.

4.10.2 Vorratslösung 2

5,0 g $\text{CuSO}_4 \cdot 5 \text{H}_2\text{O}$ in 1000 ml Essigsäure, $w = 20\%$ ¹⁾, lösen

4.11 Harnstoff

4.12 Dithiothreitol

5 Geräte und Hilfsmittel

Übliche Laboratoriumsgeräte und insbesondere die folgenden:

5.1 Glasplatten, 260 mm × 125 mm × 4 mm; **Gummiroller** mit Walzenbreite 15 cm; **Nivelliertisch**.

5.2 Gelträgerfolie, 265 mm × 125 mm.

5.3 Gegenfolie, 280 mm × 125 mm. Auf beiden Längsseiten jeweils einen Streifen (280 mm × 6 mm × 0,25 mm) eines Prägebandes (Abstandhalter) kleben (siehe Bild A.1).

5.4 Elektrofokussierkammer mit Kühlplatte, (z. B. 265 mm × 125 mm) und geeignetem Spannungsgeber (max. 3000 V) oder Elektrophoreseautomat.

5.5 Kühlthermostat, auf $12^\circ\text{C} \pm 0,5^\circ\text{C}$ einstellbar.

5.6 Zentrifuge, einstellbar auf 3000 g.

5.7 Elektrodenstreifen, mit einer Länge von ≥ 265 mm.

5.8 Tropfflaschen aus Kunststoff, für Anoden- und Kathodenlösung.

5.9 Probenapplikatoren, 10 mm × 5 mm (Viskose oder Filterpapier mit geringer Proteinadsorption).

5.10 Scheren, Skalpelle, Spatel und Pinzetten, aus Edelstahl.

5.11 Färbe-, Entfärbeschalen, aus Edelstahl (z. B. Instrumentenschalen 280 mm × 150 mm).

5.12 Regelbarer Stabhomogenisator, Drehzahlbereich 8000 min^{-1} bis $20\,000 \text{ min}^{-1}$.

5.13 Magnetrührer.

5.14 Ultraschallbad.

5.15 Folienschweißgerät und geeignete **Folie aus Polyester**.

5.16 Mikroliterpipetten 5 μl bis 25 μl .

5.17 Rotationsverdampfer oder **Vakuumzentrifuge** (Konzentrator).

5.18 Wasserbad mit Schüttleinrichtung, einstellbar auf $37^\circ\text{C} \pm 1^\circ\text{C}$ und $40^\circ\text{C} \pm 1^\circ\text{C}$.

6 Probenahme

Nach DIN 10327

7 Durchführung

7.1 Probenvorbereitung

7.1.1 Isolierung der bei pH 4,6 unlöslichen Proteine

7.1.1.1 Standardverfahren

Die einer Trockenmasse von etwa 5 g entsprechende Menge wird in ein 100-ml-Zentrifugenglas eingewogen und mit destilliertem Wasser auf 60 ml aufgefüllt. Die Mischung wird mit einem Stabhomogenisator bei 8000 min^{-1} bis $10\,000 \text{ min}^{-1}$ homogenisiert. Mit Essigsäure nach 4.5 wird der pH-Wert auf $\text{pH} = 4,6$ eingestellt und anschließend zentrifugiert (5 min, 3000 g). Fett und Molke werden dekantiert. Der Rückstand wird in 40 ml destilliertem Wasser (mit Essigsäure nach 4.5 auf $\text{pH} = 4$ bis 5 eingestellt) homogenisiert ($20\,000 \text{ min}^{-1}$), 20 ml Dichlormethan nach 4.5 zugesetzt und erneut homogenisiert. Danach wird abzentrifugiert (5 min, 3000 g). Die zwischen wässriger und organischer Phase schwimmende Caseinschicht (siehe Bild A.2) wird mit einem Spatel angehoben, und beide Phasen werden abgegossen. Das Casein wird erneut in 40 ml destilliertem Wasser (siehe oben) und 20 ml Dichlormethan nach 4.5 homogenisiert und abzentrifugiert. Dieser Vorgang wird so lange wiederholt, bis beide Extraktionsphasen farblos sind (2- bis 3mal). Die Proteinrückstände werden mit 50 ml Aceton nach 4.5 homogenisiert und über ein Faltenfilter abfiltriert. Der Rückstand wird 2mal mit je 25 ml Aceton auf dem Filter nachgewaschen und an der Luft oder im Stickstoffstrom getrocknet und in einer Reibschale fein pulverisiert.

7.1.1.2 Schnellverfahren

Die einer Trockenmasse von etwa 5 g entsprechende Menge wird 2mal mit je 50 ml Aceton nach 4.5 homogenisiert ($20\,000 \text{ min}^{-1}$), 5 min ruhen gelassen und dann abzentrifugiert (5 min, 3000 g). Proteinrückstände werden wie in 7.1.1.1 beschrieben mit Aceton getrocknet.

ANMERKUNG: Trockene Proteinisolate sind bei Raumtemperatur unbegrenzt haltbar. Die nach dem Standardverfahren isolierten Proteine ergeben bei der isoelektrischen Fokussierung etwas bessere Trennbilder.

7.1.2 Enzymatische Vorbehandlung der Proteine

7.1.2.1 Plasminspaltung (Sensitiver Kuhmilchnachweis über die γ -Caseine)

20 mg Proteinisolat (aus dem Standardverfahren) bzw. 35 mg Proteinisolat (aus dem Schnellverfahren) werden in 0,5 ml Ammoniumcarbonat-Pufferlösung nach 4.7.1.1 suspendiert und 20 min unter Ultraschalleinwirkung homogenisiert. Dann wird auf 40°C temperiert und 10 μl Plasmin nach 4.7.1.2 zugegeben, gemischt und während 1 h unter Schütteln bei 40°C inkubiert. Zur Enzyminhibierung werden 20 μl ϵ -Aminocaprinsäurelösung nach 4.7.1.3 zugegeben und die Lösung im Vakuum bei max. 40°C eingetrocknet. Die Rückstände werden in 0,5 ml Protein-Pufferlösung, nach 4.6, aufgenommen.

ANMERKUNG: Die Plasminspaltung ist in jedem Fall durchzuführen, sie führt zu einer etwa 5- bis 7fachen Zunahme der γ -Caseine und damit zur Erhöhung der

¹⁾ Siehe Seite 1

⁶⁾ Colour Index, The Society of Dyers and Colorists, Bradford (England) and The American Association of textile Chemists and Colorists, North Carolina (USA), 1971