



中华人民共和国国家标准

GB/T 38792—2020

蛋白质致敏性细胞学评价技术规范

Technical specification for cytological evaluation of protein allergenicity

2020-04-28 发布

2020-11-01 实施

国家市场监督管理总局
国家标准化管理委员会 发布

前 言

本标准按照 GB/T 1.1—2009 给出的规则起草。

本标准由中国标准化研究院提出并归口。

本标准起草单位：中国标准化研究院、江南大学、北京萨姆伯科技有限公司、石家庄君乐宝乳业有限公司。

本标准主要起草人：马爱进、吴晓玲、胥传来、匡华、袁爱梦、刘丽强、马伟、徐丽广、王忠兴、郝帅、柴艳兵、张耀广。



蛋白质致敏性细胞学评价技术规范

1 范围

本标准规定了蛋白质致敏性细胞学评价要求、证实方法。

本标准适用于由免疫球蛋白 E(IgE) 介导的食品蛋白质致敏性的细胞学评价。

2 规范性引用文件

下列文件对于本文件的应用是必不可少的。凡是注日期的引用文件,仅注日期的版本适用于本文件。凡是不注日期的引用文件,其最新版本(包括所有的修改单)适用于本文件。

GB/T 6682 分析实验室用水规格和试验方法

3 术语和定义

下列术语和定义适用于本文件。

3.1

蛋白质致敏性 protein allergenicity

由蛋白质诱发机体发生过敏反应的特性。

注:本标准中的蛋白质致敏性特指由嗜碱性粒细胞(RBL-2H3)表面结合的 IgE 与蛋白质相互作用后导致 β -氨基己糖苷酶释放的程度。

4 要求

4.1 按照相关法律法规和标准要求对样品进行接收、保管、交接、配制、回收、退还/销毁处理,并制定相应的管理制度和程序。

4.2 实验室应符合生物安全一级要求。细胞实验工作区一般要由准备室、缓冲间、无菌室、细胞保存室组成。其中,缓冲间面积应不小于 3 m^2 ,并设有更衣柜和紫外灯,紫外灯的强度为不少于 1.5 W/m^3 。紫外灯源距地面不应超过 2.5 m ,每次照射时间为 $20\text{ min}\sim 30\text{ min}$ 。无菌室无菌等级的最低标准应达到万级。

4.3 评价使用的仪器与设备种类、数量、性能、量程、精度应能满足评价的需要。评价需要的器皿材料应经过无菌处理,试验操作过程均为无菌操作。

4.4 实验用水应满足 GB/T 6682 的要求,所使试剂使用前都需经无菌处理。

4.5 评价实验结束后,实验材料应进行无害化处理。

4.6 蛋白质致敏性评价结果以 β -氨基己糖苷酶最大释放率表示。

4.7 评价结果应表述出评价蛋白的名称、纯度、使用浓度、 β -氨基己糖苷酶最大释放率。

5 证实方法

5.1 β -氨基己糖苷酶释放率测定

5.1.1 样品前处理

5.1.1.1 固体样品

5.1.1.1.1 植物性样品

将待测样品粉碎、450 μm 微孔滤膜过滤后,准确称取 5.00 g 于聚丙烯离心管中,向离心管中加入 40 mL 水,充分振荡混匀。将离心管水平置于振荡器中,室温下 100 次/min,振荡 12 h,5 000 r/min 离心 10 min,小心吸取上清液于另一个干净的聚丙烯离心管中,真空冷冻干燥,固体蛋白粉末可于 2 $^{\circ}\text{C}$ ~ 8 $^{\circ}\text{C}$ 贮存,时间不超过 24 h。

5.1.1.1.2 动物性样品

将待测样品搅碎匀浆后,准确称取 5.00 g,置于漏斗中,加入 50 mL 石油醚进行连续 3 次冲洗后,放入烘箱中烘干。将烘干后的样品置于聚丙烯离心管中,向离心管中加入 10 mL 15% 三氯乙酸溶液(体积分数),充分振荡混匀,静置 10 min。样品溶液 5 000 r/min 离心 10 min,小心吸取上清液于另一个干净的聚丙烯离心管中,真空冷冻干燥,固体蛋白粉末可于 2 $^{\circ}\text{C}$ ~ 8 $^{\circ}\text{C}$ 贮存,时间不超过 24 h。

5.1.1.2 液体或半液体样品

称取 5.00 g 液体样品,置于漏斗中,加入 50 mL 石油醚进行连续 3 次冲洗后,放入烘箱中烘干。将烘干后的样品置于聚丙烯离心管中,加入 40 mL 水,充分振荡混匀,将离心管水平置于振荡器中,室温下 100 次/min,振荡过夜 12 h,5 000 r/min 离心 10 min,小心吸取上清液于另一个干净的聚丙烯离心管中,真空冷冻干燥,固体蛋白粉末可于 2 $^{\circ}\text{C}$ ~ 8 $^{\circ}\text{C}$ 贮存,时间不超过 24 h。

5.1.2 样品溶液制备

称取上述蛋白样品 50.0 mg,用 PBS 缓冲液(参见附录 A)溶解并定容至 50 mL 容量瓶中,配制成质量浓度为 1 mg/mL 的储备溶液。试验时用 Tyrode's 液(参见附录 A)稀释成一定浓度的工作液,现用现配。

5.1.3 细胞培养

将 RBL-2H3 细胞(参见附录 A)置于细胞培养瓶中,加入 10 mL 的细胞培养液(参见附录 A),于 37 $^{\circ}\text{C}$,5% 二氧化碳细胞培养箱中培养 48 h~72 h,倒置显微镜下观察细胞生长情况。当细胞生长至培养瓶的 80%~90%时,进行细胞计数和细胞接种。

5.1.4 细胞接种

将细胞培养液从细胞培养瓶内吸出,用 PBS 缓冲液洗细胞一次。向细胞培养瓶内加入 2.0 mL 胰蛋白酶溶液(参见附录 A),于 37 $^{\circ}\text{C}$ 消化 2 min~4 min。在倒置显微镜下观察细胞消化情况,当细胞变圆接近脱壁时,将胰蛋白酶溶液倒掉。加入 10 mL 细胞培养液,用吸管吹打,使细胞脱壁制成细胞悬液。吸取细胞悬液,以 200 μL /孔加到细胞培养板中,使细胞接种密度为 1×10^5 细胞/mL。37 $^{\circ}\text{C}$,5% 二氧化碳细胞培养箱中培养 24 h 使其贴壁。

5.1.5 细胞活化

将细胞培养液从细胞培养板内吸出,用 PBS 缓冲液洗细胞三次。以 200 μL /孔向细胞培养板内加入含 50 $\mu\text{g}/\text{mL}$ IgE(参见附录 A)的细胞培养液,37 $^{\circ}\text{C}$,5% 二氧化碳细胞培养箱中继续培养 24 h。

5.1.6 细胞与蛋白的激发作用

5.1.6.1 样品组

将细胞培养液从细胞培养板内吸出,用 PBS 缓冲液洗细胞三次。分别以 50 μL /孔向细胞培养板内加入不同浓度的待测蛋白工作液,37 $^{\circ}\text{C}$,5% 二氧化碳细胞培养箱中反应 45 min。反应结束后,放入冰水中终止反应。上述各项均设 3 个复孔。

5.1.6.2 全部释放组

将细胞培养液从细胞培养板内吸出,用 PBS 缓冲液洗细胞三次。以 50 μL /孔向细胞培养板内加入细胞裂解液(参见附录 A),轻轻吹打使裂解液和 RBL-2H3 细胞充分接触,4 $^{\circ}\text{C}$ 反应 45 min 后,吸取全部细胞培养上清,1 200 r/min 离心 5 min,收集细胞上清液。上述设 3 个复孔。

5.1.6.3 空白对照组

将细胞培养液从细胞培养板内吸出,用 PBS 缓冲液洗细胞三次。以 50 μL /孔向细胞培养板内加入 Tyrode's 液,37 $^{\circ}\text{C}$,5% 二氧化碳细胞培养箱中反应 45 min。反应结束后,放入冰水中终止反应。上述设 3 个复孔。

5.1.7 测定

吸取 5.1.6 中作用后的反应液,以 30 μL /孔转移至新的细胞培养板中,以 50 μL /孔向细胞培养板内加入 PNP-NAG 溶液(参见附录 A),37 $^{\circ}\text{C}$ 反应 1 h 后,以 200 μL /孔加入碳酸钠终止液(参见附录 A)终止反应,用酶标仪在波长 405 nm 处测各孔吸光度值。样品组的吸光度标记为 A_1 ,空白对照组的吸光度标记为 A_0 ,全部释放组标记为 A_m 。

5.2 β -氨基己糖苷酶释放率结果计算

β -氨基己糖苷酶释放率按式(1)计算:

$$R = \frac{(A_1 - A_0)}{(A_m - A_0)} \times 100\% \quad \dots\dots\dots (1)$$

式中:

R —— β -氨基己糖苷酶释放率;

A_1 ——样品组的吸光度;

A_0 ——空白对照组的吸光度;

A_m ——全部释放组的吸光度。

平行样的平均值为最终释放率值,计算结果保留到小数点后两位。

附 录 A
(资料性附录)
溶 液 配 制

A.1 水

GB/T 6682 规定的二级水。

A.2 0.01 mol/L 磷酸盐缓冲液(PBS 缓冲液)

称取 7.90 g 氯化钠、1.44 g 磷酸氢二钠、1.80 g 磷酸二氢钾、0.20 g 氯化钾,用 980 mL 水溶解,用盐酸调节 pH 至 7.2,再加水定容至 1 000 mL,0.22 μm 微孔滤膜滤过除菌,4 $^{\circ}\text{C}$ 保存备用或选用同类商品化产品。

A.3 0.001 mol/L 对硝基苯-N-乙酰- β -D-氨基葡萄糖苷溶液(PNP-NAG 溶液)

称取 34.2 mg PNP-NAG,加水溶解并定容至 100 mL,0.22 μm 微孔滤膜滤过除菌,4 $^{\circ}\text{C}$ 保存备用。

A.4 0.1 mol/L 碳酸钠终止液

称取 1.06 g 碳酸钠,加水溶解并定容至 100 mL,0.22 μm 微孔滤膜滤过除菌,4 $^{\circ}\text{C}$ 保存备用。

A.5 台氏液(Tyrode's 液)

称取 7.90 g 氯化钠、0.20 g 氯化钾、0.26 g 七水硫酸镁、0.07 g 二水磷酸二氢钠、1.00 g 碳酸氢钠、0.20 g 氯化钙和 1.00 g 葡萄糖,用 980 mL 水溶解,用盐酸调节 pH 至 7.2,再加水定容至 1 000 mL,0.22 μm 微孔滤膜滤过除菌,4 $^{\circ}\text{C}$ 保存备用或选用同类商品化产品。

A.6 细胞培养液

Eagle 最低必需培养基(Eagle's Minimal Essential Medium, MEM),加入小牛血清和青霉素-链霉素,配制成含体积分数为 10% 小牛血清、1% 青霉素-链霉素的细胞培养液,其中青霉素和链霉素的终浓度分别是 100 U/mL 和 100 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 。EMEM 培养基可选用各种商品供应的粉末培养基,按生产厂商提供资料配制并除菌,4 $^{\circ}\text{C}$ 保存备用。

A.7 细胞裂解液

商品化 1% Triton X-100 细胞裂解液,主要成分为 50 mmol Tris-HCl(pH 7.2)、150 mmol 氯化钠和 5 mmol 乙二醇四乙酸、体积分数为 1% 曲拉通 X-100。0.22 μm 微孔滤膜过滤除菌,4 $^{\circ}\text{C}$ 保存备用。

A.8 胰蛋白酶溶液

称取 2.50 g 胰蛋白酶(活力 1 : 250),加入 1 000 mL PBS 缓冲液(A.2),混匀,0.22 μm 微孔滤膜过滤除菌,4 $^{\circ}\text{C}$ 保存备用或选用同类商品化产品。

A.9 嗜碱性粒细胞(RBL-2H3 细胞)

大鼠嗜碱性粒细胞性白血病细胞,ATCC CRL-2256 细胞株。

A.10 IgE 球蛋白



鼠源,纯度 >95%,质量浓度 >50 $\mu\text{g}/\text{mL}$,可选用各种同类商品化产品。

库七七 www.kq99w.com 提供下载