

ICS 点击此处添加 ICS 号

CCS 点击此处添加 CCS 号

T/

团体标准

T/

XXXX—XXXX

食品中过敏原成分检测方法

第二部分：酶联免疫法检测牛奶成分

Detection of allergen components in food—
Part II: Protocol of enzyme-linked immunosorbent assay (ELISA)
for detecting milk component

草案版次选择

在提交反馈意见时，请将您知道的相关专利连同支持性文件一并附上。

XXXX - XX - XX 发布

XXXX - XX - XX 实施

发布

前 言

本文件按照GB/T 1.1—2020《标准化工作导则 第1部分：标准化文件的结构和起草规则》的规定起草。

T/XXX《食品中过敏原成分检测方法》分为3个部分：

- 第二部分：酶联免疫法检测牛奶成分；
- 第二部分：胶体金免疫层析法检测牛奶成分。

本部分为T/XXX的第二部分。

本部分附录A为：（资料性）过敏原成分定量检测试剂盒

本部分由中国食品工业协会提出并归口。

食品中过敏原成分检测方法

第二部分：酶联免疫法检测牛奶成分

1 范围

T/xxx的本部分规定了食品中过敏原牛奶成分的酶联免疫检测方法。

本部分适用于食品原料及终产品中过敏原牛奶成分的定量检测，也可用于生产加工设备表面环境采样以及清洗水中的牛奶残留成分验证。

2 规范性引用文件

下列文件中的内容通过文中的规范性引用而构成本文件必不可少的条款。其中，注日期的引用文件，仅该日期对应的版本适用于本文件；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

过敏原 allergen

能够诱发机体产生过敏反应的抗原物质，又称为致敏原、变态反应原。

3.2

食品过敏原 food allergen

普通食品中正常存在的天然或人工添加物质，过敏体质人群食用后会诱发其过敏反应。

4 检测原理

本方法的检测原理为抗原-抗体特异性结合反应，采用夹心式酶联免疫吸附方法。微孔中包被有特异性抗牛奶蛋白的抗体，将样品提取液加入到微孔中，若样品中存在牛奶蛋白，其在孵育期间会与抗体结合，而任何未结合的蛋白都会在清洗过程中被冲走；然后加入酶标记抗体，酶标抗体会与已经结合到包被抗体上的牛奶蛋白进行结合；在经过第二次洗涤后，添加底物进行显色，在酶标仪上读取吸光度。利用牛奶蛋白标准品的吸光度制作标准曲线，并通过标准曲线计算出样品中过敏原牛奶成分的含量。

5 试剂与材料

5.1 水

按照GB/T 6682 规定的一级水。

5.2 牛奶酶联免疫检测试剂盒

参见附录A。

6 仪器与设备

6.1 电子天平：感量 0.1g。

6.2 能保持 $60^{\circ}\text{C} \pm 1^{\circ}\text{C}$ 的恒温振荡水浴锅或等同设备

6.3 研钵及粉碎装置。

6.4 微量可调单通道移液器：量程 $50 \mu\text{L} \sim 200 \mu\text{L}$ 。

- 6.5 微量可调 12 通道移液器:量程 50 μL~300 μL。
 6.6 酶标仪:波长 650nm。
 6.7 试剂瓶:容量 1L。
 6.8 洗板机或等同设备。

7 检测方法

7.1 试剂准备

- 7.1.1 提取液的配制与预热:从试剂盒中取 1 袋磷酸盐缓冲液,用纯水定容至 1L,即为 10mmol/L 的提取液。加盖,摇动混匀,置于热水浴中,使其预热到 60℃。
 7.1.2 洗涤缓冲液的配制:将试剂盒中的 1 瓶洗涤浓缩液用纯水定容至 1L, 2℃~8℃冷藏待用。

7.2 试样的制备与提取

- 7.2.1 取 5g 研磨好的固体试样(或 5mL 液体试样)加到样品提取杯中,每个样品同时做两份平行样。
 7.2.2 每个样品提取杯中加入 1.0g 牛奶提取添加剂、125 mL 预热到 60℃的提取液(若为液体试样,提取液加 120mL),盖紧杯口。
 7.2.3 在 60℃水浴锅中以 150 r/min 振荡提取杯 15 min,之后静置 5min 使样品冷却。
 7.2.4 直接吸取上清液进行测试(勿进行过滤或离心)。

7.3 测试步骤

- 7.3.1 测试前应把所有的试剂恢复至室温(18℃~30℃)。
 7.3.2 取一定数量的微孔放在微孔支架上,标记标准液和测试样的位置。
 7.3.3 用移液器吸取 100 μL 标准液和样品测试液至各个微孔中,将微孔板在台面上以圆周运动方式混匀约 20 s,在微孔上覆盖封孔膜,室温(18℃~30℃)孵育 10 min。
 7.3.4 倒掉各微孔中的溶液,加洗涤缓冲液 200 μL 洗涤微孔,重复 10 次。将微孔倒置于吸水纸巾上,反复轻扣,尽可能将微孔中残留液体倒出。该步骤也可用洗板机进行洗涤。
 7.3.5 用移液器吸取 100 μL 酶标记抗体至各个微孔中,将微孔板在台面上以圆周运动方式混匀约 20 s,在微孔上覆盖封孔膜,室温(18℃~30℃)孵育 10 min。
 7.3.6 重复 7.3.4 的洗涤步骤。
 7.3.7 用移液器吸取 100 μL 底物溶液至各个微孔中,将微孔板在台面上以圆周运动方式混匀约 20 s,在微孔上覆盖封孔膜,室温(18℃~30℃)孵育 10 min。
 7.3.8 用移液器吸取 100 μL 终止液至各个微孔中,将微孔板在台面上以圆周运动方式混匀约 20 s。
 7.3.9 用酶标仪检测各微孔在 650 nm 波长的吸光度(OD)。

8 结果计算与报告

8.1 数据计算

读取 OD 值,根据计算式(1),计算每一标准溶液浓度的 logit 和 lg 值。

$$\text{logit}_n = \ln \frac{\frac{A_n \times 100}{A_0}}{100 - \frac{A_n \times 100}{A_0}} \dots\dots\dots (1)$$

式中:

$A_n = 3 - OD_n$;

$A_0 = 3 - OD_0$;

n 为标准溶液的浓度值。

8.2 标准曲线绘制

以标准溶液浓度的 lg 值为横坐标、logit 值为纵坐标,绘制标准曲线,每次试验均应重新绘制标准曲线。

8.3 计算试样中牛奶成分含量

8.3.1 根据每个样品的 OD 值计算出 logit 值, 利用标准曲线计算出样品中过敏原牛奶成分含量 $1g$ 值 B , 则样品中过敏原牛奶成分的含量即为 $X (\mu g/mL) = 10^B$ 。也可以使用试剂盒配套的计算软件, 输入每个检测样品的 OD 值即可直接得出样品中过敏原牛奶成分的含量。

8.3.2 如果样品的 logit 值高于标准溶液的 logit 值范围, 应对样品进行稀释后重新测试, 此时样品中过敏原牛奶成分含量应为 $X (\mu g/mL) = \text{稀释倍数} \times 10^B$ 。

8.4 质控标准

标准曲线相关系数 R 的绝对对应大于 0.98, 否则检测无效, 应重新检测。

8.5 结果报告

若样品中过敏原牛奶成分含量大于等于 $2.5 \mu g/g$ (mL), 报告样品中过敏原牛奶成分含量为 $X \mu g/g$ (mL); 若样品中过敏原牛奶成分含量小于 $2.5 \mu g/g$ (mL), 报告样品中过敏原牛奶成分为阴性 [检测下限: $2.5 \mu g/g$ (mL)]。

附 录 A
(资料性)
过敏原成分定量检测试剂盒

A.1 过敏原牛奶成分定量检测试剂盒

本标准酶联免疫测定使用的试剂盒为美国Neogen公司产品, 试剂盒包括:

- a) 48 个包被抗体微孔;
- b) 48 个样品转移微孔;
- c) 标准溶液: $0 \mu\text{g/mL}$, $2.5 \mu\text{g/mL}$, $5.0 \mu\text{g/mL}$, $10.0 \mu\text{g/mL}$, $25.0 \mu\text{g/mL}$;
- d) 酶标记抗体;
- e) 底物溶液;
- f) 终止液;
- g) 洗涤浓缩液;
- h) 磷酸盐缓冲液;
- i) 提取添加剂。

A.2 试剂盒检测范围

检测低限: $2.5 \mu\text{g/mL(g)}$ 。

定量范围: $2.5 \mu\text{g/mL(g)} \sim 25 \mu\text{g/mL(g)}$ 。