



团 体 标 准

T/ XXXX—XXXX

食品中过敏原成分检测方法

第三部分：酶联免疫法检测麸质成分

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

- 第三部分：酶联免疫法检测麸质成分；
- 第三部分：胶体金免疫层析法检测麸质成分。

本部分为T/XXX的第三部分。

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

第三部分：酶联免疫法检测麸质成分

1 范围

T/xxx的本部分规定了食品中过敏原麸质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麸质成分的定量检测，也可用于生产加工设备表面环境采样以及清洗水中的麸质残留成分验证。

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。

3.3

麸质 gluten

小麦、黑麦、大麦及其杂交种和衍生种中含有的一类蛋白质片段，由约50%的麦醇溶蛋白和约50%的麦谷蛋白组成，食用后可导致部分人群产生过敏反应。

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麦醇溶蛋白的抗体，将样品提取液加入到微孔中，若样品中存在麦醇溶蛋白，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麦醇溶蛋白进行结合；在经过第二次洗涤后，添加底物进行显色，并在酶标仪650nm的波长下读取吸光度。利用麦醇溶蛋白标准品的吸光度制作标准曲线，通过标准曲线计算出样品中麦醇溶蛋白的含量，并通过换算得出样品中麸质成分的含量。

5 试剂与材料

5.1 水

按照GB/T 6682 规定的一级水。

5.2 麦醇溶蛋白酶联免疫检测试剂盒

参见附录A。

5.3 Cocktail 提取液

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 $50^{\circ}\text{C} \pm 1^{\circ}\text{C}$ 的恒温水浴锅或等同设备。
- 6.3 定轨振荡器。
- 6.4 涡旋振荡器。
- 6.5 离心机。
- 6.6 研钵及粉碎装置。
- 6.7 微量可调单通道移液器：量程 $50\ \mu\text{L} \sim 200\ \mu\text{L}$ 。
- 6.8 微量可调 12 通道移液器：量程 $50\ \mu\text{L} \sim 300\ \mu\text{L}$ 。
- 6.9 酶标仪：波长 650nm。
- 6.10 试剂瓶：容量 1L。
- 6.11 洗板机或等同设备。

7 检测方法

7.1 试剂准备

- 7.1.1 60%乙醇提取液的配制：600mL 乙醇加 400mL 蒸馏水，混匀。
- 7.1.2 80%乙醇提取液的配制：800mL 乙醇加 200mL 蒸馏水，混匀。
- 7.1.3 PBS 稀释液的配制：从试剂盒中取 1 袋磷酸盐缓冲液，用蒸馏水定容至 1L，即为 10mmol/L 的 PBS 稀释液。
- 7.1.4 洗涤缓冲液的配制：将试剂盒中的 1 瓶洗涤浓缩液用蒸馏水定容至 1L， $2^{\circ}\text{C} \sim 8^{\circ}\text{C}$ 冷藏。

7.2 非热加工试样的制备与提取

- 7.2.1 取 1g 研磨好的固体试样(或 1mL 液体试样)加到离心管中, 每个样品同时做两份平行样。
- 7.2.2 每个样品离心管中加入 1.0g 麸质提取添加剂和 10mL 60%乙醇(若为液体试样, 加 9mL), 盖紧管口。
- 7.2.3 在室温环境下, 用定轨振荡器振荡 10min。
- 7.2.4 以 2500 r/min 以上的转速离心 10 min, 取上清液。
- 7.2.5 将 4.9mL PBS 稀释液加到新的干净试管中, 吸取 $100\ \mu\text{L}$ 上清液混匀待用。

7.3 热加工试样的制备与提取

- 7.3.1 取 0.25g 研磨好的固体试样(或 0.25mL 液体试样)加到离心管中, 每个样品同时做两份平行样。
- 7.3.2 每个样品离心管中加入 2.5mL Cocktail 提取液, 如果样品中含有荞麦、栗子粉、咖啡、可可粉、单宁类或酚类化合物, 再加入 1.0g 麸质提取添加剂, 涡旋振荡 30s。
- 7.3.3 将样品离心管置于 50°C 水浴锅中孵育 40min, 孵育完成后室温冷却 5min。
- 7.3.4 在各样品离心管中再加入 7.5mL 80%乙醇, 混匀后使用定轨振荡器振荡 60min。
- 7.3.5 以 2500 r/min 以上的转速离心 10 min, 取上清液。
- 7.3.6 将 2.3mL PBS 稀释液加到新的干净试管中, 吸取 $200\ \mu\text{L}$ 上清液混匀待用。

7.4 测试步骤

- 7.4.1 测试前应把所有的试剂恢复至室温($18^{\circ}\text{C} \sim 30^{\circ}\text{C}$)。
- 7.4.2 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。
- 7.4.3 用移液器吸取 $100\ \mu\text{L}$ 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($18^{\circ}\text{C} \sim 30^{\circ}\text{C}$)孵育 10 min。
- 7.4.4 倒掉各微孔中的溶液, 加洗涤缓冲液 $200\ \mu\text{L}$ 洗涤微孔, 重复 5 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。

7.4.5 用移液器吸取 100 μ L 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。

7.4.6 重复 7.4.3 的洗涤步骤。

7.4.7 用移液器吸取 100 μ L 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。

7.4.8 用移液器吸取 100 μ L 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。

7.4.9 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 计算试样中麸质成分含量

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麦醇溶蛋白的含量 lg 值 B,则样品中麦醇溶蛋白的含量即为 $X(\mu\text{g/mL}) = 10^B$ 。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麦醇溶蛋白的含量,将该数值乘以 2 即为样品中麸质成分的含量。

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,此时样品中麦醇溶蛋白含量应为 $X(\mu\text{g/mL}) = \text{稀释倍数} \times 10^B$,将该数值乘以 2 即为样品中麸质成分的含量。

8.4 质控标准

标准曲线相关系数 R 的绝对值应大于 0.98,否则检测无效,应重新检测。

8.5 结果报告

若样品中麸质成分含量大于等于 5 $\mu\text{g/g}(\text{mL})$,报告样品中麸质成分含量为 $2X \mu\text{g/g}(\text{mL})$;若样品中麸质成分含量小于 5 $\mu\text{g/g}(\text{mL})$,报告样品中过敏原麸质成分为阴性[检测低限:5 $\mu\text{g/g}(\text{mL})$,以麸质计]。

附 录 A
(资料性)
过敏原成分定量检测试剂盒

A.1 过敏原麸质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: $0\ \mu\text{g/mL}$, $2.5\ \mu\text{g/mL}$, $5.0\ \mu\text{g/mL}$, $10.0\ \mu\text{g/mL}$, $20.0\ \mu\text{g/mL}$, $40.0\ \mu\text{g/mL}$;
- 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 Cocktail 提取液

Cocktail提取液为美国Neogen公司产品, 该提取液可破坏样品中麦醇溶蛋白分子的聚合, 从而实现
对热加工食品中全部构型麦醇溶蛋白的提取。

A.3 试剂盒检测范围

检测低限: $2.5\ \mu\text{g/mL(g)}$, 以麦醇溶蛋白计; $5\ \mu\text{g/mL(g)}$, 以麸质成分计。

定量范围: $2.5\ \mu\text{g/mL(g)} \sim 40\ \mu\text{g/mL(g)}$, 以麦醇溶蛋白计; $5\ \mu\text{g/mL(g)} \sim 80\ \mu\text{g/mL(g)}$, 以麸质成分计。