



中华人民共和国出入境检验检疫行业标准

SN/T 1961.3—2012

食品中过敏原成分检测方法 第 3 部分：酶联免疫吸附法检测 荞麦蛋白成分

Detection of allergen components in food—
Part 3: Protocol of the Enzyme-linked immunosorbent assay
for detecting buckwheat protein component

2012-05-07 发布

2012-11-16 实施

中 华 人 民 共 和 国
国家质量监督检验检疫总局 发布

前 言

本部分按照 GB/T 1.1—2009 给出的规则起草。

请注意本文件的某些内容可能涉及专利。本文件的发布机构不承担识别这些专利的责任。

本部分由国家认证认可监督管理委员会提出并归口。

本部分的起草单位：中华人民共和国吉林出入境检验检疫局、中华人民共和国上海出入境检验检疫局、中华人民共和国江苏出入境检验检疫局、吉林省产品质量监督检验院。

本部分主要起草人：刘金华、张舒亚、刘阳、宋战昀、魏春艳、孟日增、王振国、祝长青、史艳宇、吴连鹏。

食品中过敏原成分检测方法

第3部分:酶联免疫吸附法检测

荞麦蛋白成分

1 范围

SN/T 1961 的本部分规定了食品中过敏原荞麦蛋白成分的酶联免疫吸附检测方法。

本部分适用于烘培类食品(饼干、面包、糕点等)、面条、(小麦、玉米)面粉、粥、豆粉、寿司、米粉等各种食品中过敏原荞麦蛋白成分的测定。

本方法对标准荞麦蛋白定量检测范围:0.78 ng/mL~50 ng/mL。

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

过敏原 allergen

能够诱发机体发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,被过敏体质人群消费后能够诱发过敏反应。

4 原理

本方法检测原理是抗原-抗体特异性结合反应,采用双抗夹心酶联免疫分析技术。微孔中包被有特异性抗荞麦蛋白的多克隆抗体,加入样品提取液后,样品中的荞麦蛋白即可特异地与微孔中的抗荞麦蛋白抗体结合。经过洗板去除没有结合的成分后,再加入生物素标记抗体,形成抗体-抗原-抗体复合物。洗去没有结合的生物素标记抗体,再分别加入链菌素-酶偶合物及显色剂进行颜色反应,使用酶标仪在450 nm 波长下对吸光度值测量。利用标准品的吸光度值对标准品浓度制作标准曲线,并通过标准曲线求得试样中荞麦蛋白含量。

5 试剂与材料

5.1 水

按照 GB/T 6682 规定的一级水。

5.2 荞麦酶联免疫吸附检测试剂盒

参见附录 A。

6 仪器与设备

- 6.1 水浴锅:温度 $60\text{ }^{\circ}\text{C} \pm 1\text{ }^{\circ}\text{C}$ 。
- 6.2 离心机:最大离心力大于或等于 $3\ 000\text{ }g$ 。
- 6.3 酶标仪:测量波长 450 nm ,参比波长 $600\sim 650\text{ nm}$ 。
- 6.4 振荡器:振荡频率大于或等于 $100\text{ 次}/\text{min}$ 。
- 6.5 电子天平:感量 $0.01\text{ }g$ 。
- 6.6 微量可调单通道移液器:量程 $50\ \mu\text{L}\sim 200\ \mu\text{L}$ 。
- 6.7 微量可调 8 通道移液器:量程 $100\ \mu\text{L}\sim 200\ \mu\text{L}$ 。

7 测定方法

7.1 试样的制备与处理

- 7.1.1 样品经充分研磨后,称取 $1\text{ }g$ 于 50 mL 离心管中,加入 19 mL 提取液(配制方法见 7.2.2),充分振荡混匀。
- 7.1.2 调节其 pH 值在中性范围内($\text{pH}6.0\sim 8.0$),将离心管水平置于振荡器中,室温下 $100\text{ 次}/\text{min}$ 振荡过夜(至少 12 h)。
- 7.1.3 $3\ 000\times g$ 离心 20 min 取上清液。
注:如有油层,要将其去掉,每个样品尽可能吸取相同体积的上清液。
- 7.1.4 将吸取的上清液用稀释液 20 倍稀释后用于测试。

7.2 试剂准备

7.2.1 实验前将适量的稀释液、终止液、底物(底物需要避光)从试剂盒中取出,平衡至室温($20\text{ }^{\circ}\text{C}\sim 25\text{ }^{\circ}\text{C}$)。

7.2.2 提取液配制,将提取液①/提取液②/提取液③/水按 $1:1:1:17$ 比例混合,20 倍稀释后备用。

示例:

对于 24 个样品的用量:

提取液①($20\times$): 25 mL ;

提取液②($20\times$): 25 mL ;

提取液③($20\times$): 25 mL ;

水: 425 mL ;

总体积: 500 mL 。

7.2.3 标准溶液配制,用稀释液 20 倍稀释提取液制成标准稀释液。用标准稀释液 2 倍系列稀释标准母液($50\text{ ng}/\text{mL}$),分别配制成 $25\text{ ng}/\text{mL}$ 、 $12.5\text{ ng}/\text{mL}$ 、 $6.25\text{ ng}/\text{mL}$ 、 $3.125\text{ ng}/\text{mL}$ 、 $1.5625\text{ ng}/\text{mL}$ 、 $0.78125\text{ ng}/\text{mL}$ 的标准溶液。

7.2.4 洗液,用水 10 倍稀释。

7.2.5 生物素标记抗体,用稀释液 100 倍稀释,15 min 内使用。

7.2.6 链菌素-酶偶合物,用稀释液 100 倍稀释,15 min 内使用。

注:实验后将所有试剂立即放回 $4\text{ }^{\circ}\text{C}$ 。未使用的预包被荞麦蛋白抗体的可拆分微孔板条应放回装有干燥剂的铝箔袋内密封保存。

7.3 测试步骤

- 7.3.1 将预包被荞麦蛋白抗体的微孔板条放入微孔板架上并编号,保证每个浓度的标准品和试样液各使用3个微孔进行实验。
- 7.3.2 使用单通道移液器对应编号分别在微孔中加入100 μL标准品和试样液,在台面上以圆周方式混合微孔板约10 s,在微孔板上盖上封孔膜,室温下静置孵育60 min。
- 7.3.3 将微孔中的液体倾倒至水槽中,并在纸巾上轻扣,尽可能将微孔中残留液体倒出。使用8通道移液器在每个微孔中加入250 μL洗涤缓冲液洗板。重复洗板步骤,共洗板5次,此步骤也可用洗板机完成。
- 7.3.4 最后一次洗板后,将微孔板倒置在已铺好洁净吸水纸的平整桌面上,轻扣微孔板,尽可能将微孔中残留液体倒出,直至吸水纸无水渍即可。
- 7.3.5 按照120 μL/孔的体积计算所需的生物素-抗体标记物用量。将所需用量的生物素-抗体标记物移取到洁净的试剂槽中,并使用8通道移液器在每个微孔中各加入100 μL,在台面上以圆周方式混合微孔板约10 s,在微孔板上盖上封孔膜,室温下静置孵育60 min。
- 7.3.6 按照7.3.3洗板5次,并按照7.3.4倒出微孔中的残留液体。
- 7.3.7 按照120 μL/孔的体积计算所需的链菌素-酶标偶合物用量。将所需用量的链菌素-酶标偶合物移取到洁净的试剂槽中,并使用8通道移液器在每个微孔中各加入100 μL,在台面上以圆周方式混合微孔板约10 s,在微孔板上盖上封孔膜,室温下静置孵育30 min。
- 7.3.8 按照7.3.6进行操作。
- 7.3.9 按照120 μL/孔的体积计算所需的显色剂溶液用量。将所需用量显色剂溶液取到洁净的试剂槽中,并使用8通道移液器在每个微孔中各加入100 μL,在台面上以圆周方式混合微孔板约10 s,在微孔板上盖上封孔膜,室温下静置孵育20 min。此步骤孵育要注意避光。
- 7.3.10 按照120 μL/孔的体积计算所需的反应终止液用量。将所需用量的反应终止液移取到洁净的试剂槽中,并使用8通道移液器在每个微孔中各加入100 μL。
- 7.3.11 用酶标仪在450 nm下(参比波长620 nm)读取并记录每个微孔的吸光度值(OD)。读取数据应在加入终止液后30 min内进行,否则将影响检测结果。

8 结果计算与表述

8.1 结果计算

8.1.1 绘制标准曲线

以标准品荞麦蛋白浓度(ng/mL)为横坐标,以平均吸光度值为纵坐标,绘制标准曲线。每次测定应重新绘制标准曲线。

8.1.2 计算试样中荞麦蛋白含量

在标准曲线上查得待测试样液吸光度值所对应的荞麦蛋白浓度,乘以稀释倍数400后求得试样中荞麦蛋白含量。按照式(1)计算如下:

$$C_g = C_p \times 400 \quad \dots\dots\dots(1)$$

式中:

C_g —— 试样中的荞麦蛋白含量,ng/mL;

C_p —— 试样液吸光度值所对应的荞麦蛋白浓度,ng/mL。

测定结果用平行测定后的算术平均值表示,保留三位有效数字。

注:本方法中,荞麦蛋白提取液密度变化忽略不计,可认为1 mL提取液质量为1 mg。

8.2 结果表述

8.2.1 当通过计算求得试样中荞麦蛋白含量大于等于 0.78 ng/mg 时,测定结果为其实际测定值。

8.2.2 当通过计算求得试样中荞麦蛋白含量小于 0.78 ng/mg 时,测定结果表述为:样品中荞麦蛋白成分小于 0.78 ng/mg。

8.2.3 当所测试样的荞麦蛋白含量大于 50 ng/mg 时,应对试样用提取液继续稀释,使其测定结果处于 0.78 ng/mg~50 ng/mg 范围内,其结果计算应再乘以相应的稀释倍数。

附录 A
(资料性附录)

荞麦酶联免疫吸附检测试剂盒

本部分荞麦酶联免疫吸附检测试剂盒为日本和光纯药工业株式会社(WAKO)生产的荞麦检测试剂盒(FASTKIT ELISA Ver. II),该试剂盒包括:

- a) 预包被荞麦蛋白抗体的可拆分微孔板:96孔(12×8);
- b) 标准溶液(50 ng/mL):1.8 mL×1;
- c) 稀释液:100 mL×1;
- d) 生物素标记抗体:150 μL×1;
- e) 链菌素-酶偶合物:150 μL×1;
- f) 显色剂:12 mL×1;
- g) 反应终止液:12 mL×1;
- h) 洗液(10×):100 mL×1;
- i) 提取液①(20×):50 mL×1;
- j) 提取液②(20×):50 mL×1;
- k) 提取液③(20×):50 mL×1。

注:本部分测定方法中使用的试剂盒(FASTKIT ELISA BUCKWHEAT)是适合的市售产品的实例,其他类似试剂盒的操作步骤可能略有不同。给出这一信息是为了方便本部分的使用者,并不表示对该产品的认可。如果其他产品具有相同的效果,可经实验评估后使用这些等效产品。