

ICS 号:

CCS 号:

团体标准

T/CIFST ×××—2020

食品中乳铁蛋白的测定 酶联免疫吸附法

Detection of lactoferrin in foods enzyme-linked
immunosorbent assay method

(与国际标准一致性的标识)

(征求意见稿)

20XX-XX-XX 发布

20XX-XX-XX 实施

中国食品科学技术学会 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》给出的规则起草。

本文件由中国食品科学技术学会提出并归口。

本文件起草单位：

本文件主要起草人：

食品中乳铁蛋白的测定 酶联免疫吸附法

1 范围

本文件规定了食品中乳铁蛋白测定的酶联免疫吸附法。

本文件适用于巴氏杀菌乳、灭菌乳、调制乳、风味发酵乳、含乳饮料等含乳或添加乳成分液体食品，以及乳粉、调制乳粉、乳清粉、婴幼儿配方食品等含乳或添加乳成分固体食品中乳铁蛋白含量的测定。

2 规范性引用文件

本文件没有规范性引用文件。

3 原理

利用抗原-抗体特异性结合反应，对样品中乳铁蛋白含量进行竞争性酶联免疫吸附测定。

标准品或样品中游离的乳铁蛋白与其酶标记物竞争结合微孔中预先包被的乳铁蛋白抗体结合位点。未结合的乳铁蛋白在洗涤步骤被除去。结合的酶标记物将无色的底物转化为蓝色产物。加入反应终止液后颜色由蓝色转变为黄色。标准品或样品中乳铁蛋白含量与吸光度值成反比，通过测定 450 nm 下吸光度值和绘制标准曲线，计算得到样品中乳铁蛋白含量。

4 试剂和材料

4.1 乳铁蛋白酶联免疫吸附检测试剂盒 (EuroProxima LACTOFERRIN FAST ELISA)

参见附录 A。

4.2 纯水

不含铁成分，可使用市售瓶装饮用纯净水，不可使用蒸馏水。

5 仪器和设备

5.1 酶标仪：450 nm。

5.2 分析天平：感量 0.01 g。

5.3 涡旋混匀仪。

5.4 微孔板振荡器。

5.5 单道移液器：2 μL~20 μL，10 μL~100 μL，50 μL~200 μL，100 μL~1000 μL，500 μL~5000 μL。

5.6 八道移液器：30 μL~300 μL。

6 分析步骤

6.1 试剂配制

- 6.1.1 1×稀释缓冲液：按照 1:10 比例稀释试剂盒中 10×稀释缓冲液浓缩液，现配现用。如移取 1.0 mL 10×稀释缓冲液浓缩液到 9.0 mL 水中稀释混匀。
- 6.1.2 1×洗涤缓冲液：按照 1:20 比例稀释试剂盒中 20×洗涤缓冲液浓缩液，现配现用。如移取 1.0 mL 20×稀释缓冲液浓缩液到 19.0 mL 水中稀释混匀。1 个微孔需约 1.0 mL 1×洗涤缓冲液洗涤。
- 6.1.3 标准品：试剂盒标准品瓶中加入 2.0 mL 1×稀释缓冲液，混匀，得到浓度为 2.5 µg/mL 的标准稀释工作液。400 µL/管分装在干净的 1.5 mL 离心管中，贮-20 °C 保存至试剂盒有效期结束。每次测定前取出 1 管回复至室温，即为标准系列工作液中的 7。
- 6.1.4 梯度标准稀释工作液：贮-20 °C 的标准稀释工作液 7 回复至室温后，点甩离心，按照表 1 用 1×稀释缓冲液逐级稀释并混匀，分别得到浓度为 1.25 µg/mL 的标准稀释工作液 6、0.625 µg/mL 的标准稀释工作液 5、0.313 µg/mL 的标准稀释工作液 4、0.156 µg/mL 的标准稀释工作液 3、0.078 µg/mL 的标准稀释工作液 2 和 0 µg/mL 的标准稀释工作液 1。

表 1 梯度标准稀释工作液的配制

编号	浓度 (µg/mL)	配制方法
标准稀释工作液 1	0	200 µL 1×稀释缓冲液
标准稀释工作液 2	0.078	200 µL 标准稀释工作液 3 + 200 µL 1×稀释缓冲液
标准稀释工作液 3	0.156	200 µL 标准稀释工作液 4 + 200 µL 1×稀释缓冲液
标准稀释工作液 4	0.313	200 µL 标准稀释工作液 5 + 200 µL 1×稀释缓冲液
标准稀释工作液 5	0.625	200 µL 标准稀释工作液 6 + 200 µL 1×稀释缓冲液
标准稀释工作液 6	1.25	200 µL 标准稀释工作液 7 + 200 µL 1×稀释缓冲液
标准稀释工作液 7	2.5	标准品瓶中加入 2.0 mL 1×稀释缓冲液

- 6.1.5 1×酶标记物：使用前点甩离心。用 1×稀释缓冲液按照 1:100 比例稀释试剂盒中 100×乳铁蛋白-HRP 浓缩液，现配现用。样品数为 X 个，需配制 1×酶标记物的体积为 (7+X) ×2×50 µL+50 µL。如样品数为 1 个，需配制 850 µL 1×酶标记物，移取 8.5 µL 100×乳铁蛋白-HRP 浓缩液到 841.5 µL 1×稀释缓冲液中稀释混匀。
- 6.1.6 试剂配制前将试剂盒回复至室温，使用完尽快放置 2 °C~8 °C。

6.2 样品前处理

6.2.1 乳铁蛋白含量/标签值<20 mg/100 g (mL) 的液体样品

计算稀释倍数，使得测定前样品中乳铁蛋白的浓度在 0.156-0.313 µg/mL 之间，如稀释倍数为 200 倍，需进行二级稀释：移取 100 µL 液体样品，加入 900 µL 1×稀释缓冲液，涡旋混匀 30 s 得到一级稀释液；移取 50 µL 一级稀释液到 950 µL 1×稀释缓冲液中，漩涡混匀 30 s 后得到二级稀释液。

6.2.2 乳铁蛋白含量/标签值在<250 mg/100 g (mL) 范围内的样品

计算稀释倍数，使得测定前样品中乳铁蛋白的浓度在 0.156-0.313 µg/mL 之间，如稀释倍数为 2000 倍，固体样品称取 1.0 g (精确至 0.1 g)，液体样品移取 1.0 mL，加水至 10 mL，涡旋混匀 5 min 后，

移取 50 μL 混匀后的样品溶液至 450 μL 1 \times 稀释缓冲液中稀释混匀得到一级稀释液；移取 50 μL 一级稀释液到 950 μL 1 \times 稀释缓冲液中，涡旋混匀 30 s 后得到二级稀释液。

6.2.3 乳铁蛋白含量/标签值 ≥ 250 mg/100 g (mL) 的样品

计算稀释倍数，使得测定前样品中乳铁蛋白的浓度在 0.156-0.313 $\mu\text{g/mL}$ 之间，如稀释倍数为 40000 倍，先按照 6.2.2 进行样品前处理，称取 1.0 g (精确至 0.1 g)，加水至 10 mL，涡旋混匀 5 min，用 1 \times 稀释缓冲液稀释 400 倍后，得到样品二级稀释液。

对不含有乳铁蛋白的空白婴儿配方乳粉进行样品前处理，称取 1.0 g (精确至 0.1 g)，加水至 10 mL，涡旋混匀 5 min，用 1 \times 稀释缓冲液稀释 200 倍后，得到空白乳粉稀释液。

用空白乳粉稀释液对样品二级稀释液进行进一步稀释，移取 50 μL 样品二级稀释液到 450 μL 空白乳粉稀释液中混匀，此为用于测定的样品液。

6.3 测定

将预先包被有乳铁蛋白抗体的微孔插入微孔板架并做好标记，微孔数量包括标准稀释工作液和样品，均做 2 平行。

平行加入 50 μL 标准稀释工作液 1~7 和样品至微孔，再加入 50 μL 1 \times 酶标记物至每个微孔。使用微孔板振荡器振荡微孔板数秒，在微孔板上盖上硬纸板，20 $^{\circ}\text{C}$ ~25 $^{\circ}\text{C}$ 黑暗处避光孵育 30 min。孵育结束后，倒去微孔中的液体，每个微孔每次加入 300 μL 1 \times 洗涤缓冲液洗涤并在吸水纸上拍干，洗板 3 次。洗板结束后，加入 100 μL 底物至每个微孔，20 $^{\circ}\text{C}$ ~25 $^{\circ}\text{C}$ 黑暗处避光孵育 15 min。孵育结束后，加入 100 μL 终止液至每个微孔，并立即读取 450 nm 波长下吸光度值。

7 结果与计算

7.1 标准曲线制作和测定结果计算

标准稀释工作液 2~7 质量浓度以 10 为底的对数值为横坐标，式 (1) 计算的百分比为纵坐标，绘制标准曲线，计算样品液中乳铁蛋白浓度。

乳铁蛋白标准稀释工作液和样品液的百分比吸光度值按式 (1) 计算：

$$A = \frac{S}{S_0} \times 100\% \dots\dots\dots (1)$$

式中：

A —— 百分比吸光度值；

S —— 乳铁蛋白标准工作稀释液或样品液的平均吸光度值；

S_0 —— 标准品 1 的平均吸光度值。

可以使用试剂盒配套分析软件 RIDA[®]Soft Win 中 cubic spline 模式进行标准曲线绘制和测定结果计算。

7.2 测定结果表述

样品中乳铁蛋白含量按式 (2) 计算：

$$X = c \times f \times 100 / 1000 \dots\dots\dots (2)$$

式中：

X ——样品中乳铁蛋白含量，单位为毫克每 100 克（mg/100 g）或毫克每 100 毫升（mg/100 mL）；

c ——样品液中乳铁蛋白浓度，单位为微克每毫升（ $\mu\text{g/mL}$ ）；

f ——样品稀释倍数。

8 质量控制

8.1 试剂失效

出现以下情况之一表明试剂失效，不能进行测定或测定结果作废：

贮存在试剂瓶中的底物颜色出现蓝色；

加入底物后标准稀释工作液 1（0 $\mu\text{g/mL}$ ）微孔中液体颜色很浅，加入终止液后标准稀释工作液 1（0 $\mu\text{g/mL}$ ）吸光度值 <0.8 。

8.2 变异系数

每次测定的所有吸光度值，2 平行的变异系数（CV 值）不超过 15%。

8.3 回收率

定期进行回收率评估，回收率应在 80%~120%之间。

以灭菌乳或无人工添加的全脂乳粉为基质，进行 1~3 个水平的添加回收测试。如灭菌乳人工添加浓度分别为 2 mg/100 mL、4 mg/100 mL 和 6 mg/100 mL，乳粉人工添加浓度分别为 15 mg/100 g、30 mg/100 g 和 60 mg/100 g，按照本方法进行乳铁蛋白含量测定并计算回收率。

9 安全防护和防污染措施

9.1 实验过程应避免器具、耗材和试剂的铁质污染，实验用水尽量使用市售瓶装饮用纯净水。

9.2 实验室实施良好的防污染和清洁措施，尤其避免含有乳铁蛋白的粉末样品粉尘污染实验环境。

9.3 部分试剂具有腐蚀性，实验操作全程戴手套并及时更换手套，注意个人防护。

10 其他

本方法定量检测限为 1.56 mg/100 g（固体食品）或 1.56 mg/100 mL（液体食品）。

附录 A

(规范性)

乳铁蛋白酶联免疫吸附检测试剂盒

A.1 试剂盒组成

乳铁蛋白检测试剂盒 EuroProxima LACTOFERRIN FAST ELISA包括:

- a) 预包被乳铁蛋白抗体的 96 孔可拆分微孔板: 12×8 孔;
- b) 100×乳铁蛋白-HRP 浓缩液: 150 μL/瓶×1 瓶;
- c) 乳铁蛋白标准品冻干粉: 3 瓶;
- d) 10×稀释缓冲液浓缩液: 30 mL/瓶×1 瓶;
- e) 20×洗涤缓冲液浓缩液: 30 mL/瓶×1 瓶;
- f) 底物: 12 mL/瓶×1 瓶;
- g) 终止液: 15 mL/瓶×1 瓶。

A.2 试剂盒验收和保存

每个批号试剂盒应进行回收率测试的验收试验,回收率符合质量控制要求。

试剂盒于2℃~8℃黑暗处避光保存,使用前回复至室温。

不同批号试剂盒中组分不得混用。

超过有效期的试剂盒不得使用。

A.3 标准曲线谱图

标准曲线谱图示例见图A.1。

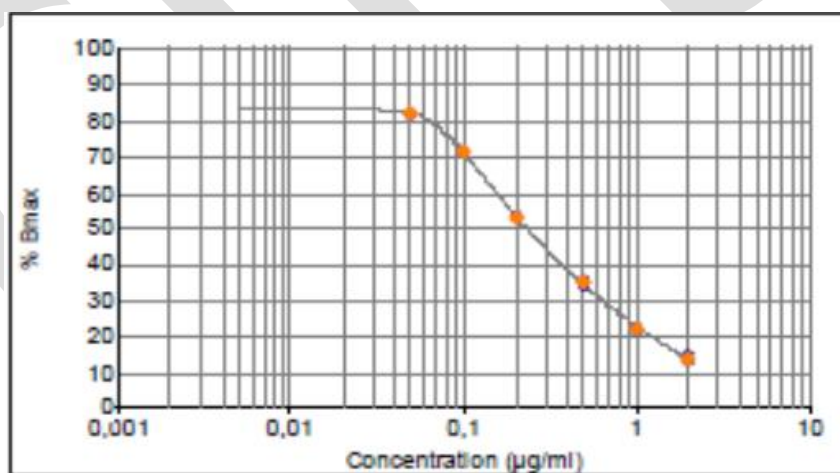


图 A.1 标准曲线谱图示例