

ICS 号：
CCS 号：

团 体 标 准

T/CIFST XXX.7—XXXX

食品及食品生产过程中食品致敏原 的免疫分析检测方法 第 7 部分：酪蛋白

Detection of food allergens in foods and during the food
production process using Immunoassay method
Part 7: Casein

（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

T/CIFST XXX 《食品及食品生产过程中食品致敏原的免疫分析检测方法》由下列 17 部分组成：

- 第 1 部分：麸质
- 第 2 部分：甲壳纲类动物
- 第 3 部分：蛋类
- 第 4 部分：花生
- 第 5 部分：大豆
- 第 6 部分：乳
- 第 7 部分：酪蛋白
- 第 8 部分： β -乳球蛋白
- 第 9 部分：扁桃仁
- 第 10 部分：腰果
- 第 11 部分：榛子
- 第 12 部分：巴西坚果
- 第 13 部分：椰子
- 第 14 部分：夏威夷果
- 第 15 部分：开心果
- 第 16 部分：核桃
- 第 17 部分：芝麻

本文件为 T/CIFST XXX 的第 7 部分。

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。

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专利的责任。

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：

食品及食品生产过程中食品致敏原的免疫分析检测方法

第 7 部分：酪蛋白

1 范围

本部分规定了食品及食品生产过程中酪蛋白的酶联免疫吸附测定方法。

本部分适用于食品中酪蛋白致敏原的酶联免疫吸附定量检测，也适用于食品生产过程中监控酪蛋白致敏原时对食品进行的定量检测。

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 6682-2008 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部分。

3.1

酪蛋白 casein

酪蛋白是一种含磷钙的结合蛋白，是奶中的主要蛋白质，具有致敏性。

酶联免疫吸附法

4 原理

标准溶液及试样中的酪蛋白与微孔板中包被酪蛋白特异性抗体结合，形成抗体-抗原复合物。随后加入的过氧化物酶标记的抗体与抗体-抗原复合物结合，形成抗体-抗原-抗体复合物。洗板后，加入底物/发色剂后呈显色反应，反应结束后加入终止液终止反应。通过测定 450 nm 波长下吸光度值，酪蛋白含量与吸光度值成正比，可以得出试样中酪蛋白致敏原含量。

5 试剂和材料

5.1 RIDASCREEN® FAST Casein¹酪蛋白酶联免疫吸附检测试剂盒

见附录 A。

5.2 试剂

除特别说明外，所有试剂均为分析纯或生化试剂。

5.2.1 氢氧化钠（NaOH）溶液（1 mol/L）：称取 40.00 g NaOH，加水溶解并定容至 1 L，混合均匀。

5.2.2 盐酸溶液（HCl）（1 mol/L）：取 8.4 mL 浓盐酸（37%），用水定容至 100 mL。

5.2.3 牛血清白蛋白：bovine Fraction V，不含蛋白酶。

6 仪器和设备

6.1 酶标仪：450 nm。

6.2 分析天平：感量 0.01 g。

6.3 涡旋混匀仪。

6.4 冷冻离心机：转速不低于 4000 r/min，可实现温度不高于 4℃。

6.5 水浴锅：37℃，60℃，100℃。

6.6 单道移液器：20 μL~200 μL，100 μL~1000 μL。

6.7 八道移液器：30 μL~300 μL。

7 分析步骤

7.1 试剂配制

配制试剂前，附录 A 中所有试剂回复至室温（20℃~25℃），使用完尽快放回 2℃~8℃，不可冷冻。未使用的微孔板孔，必须与袋中的干燥剂一起，重新放入铝箔封口袋中并封好，放置 2℃~8℃ 保存。

7.1.1 1×致敏原提取缓冲液：按照 1:10 比例稀释 10×致敏原提取缓冲液浓缩液（用水见附录 A），稀释后的 1×致敏原提取缓冲液可贮于 2℃~8℃ 下保存 12 周。稀释前，若 10×致敏原提取缓冲液浓缩液（见附录 A）中有结晶，则先将其置于 37℃ 水浴中温育并摇晃混匀，直至结晶完全消失。

7.1.2 含牛血清白蛋白的致敏原提取缓冲液：10mL 1×致敏原提取缓冲液（7.1.1）充分溶解 0.25g 牛血清白蛋白（5.2.3）。试样处理前进行配制，临用现配。

7.1.3 含添加剂 1 的致敏原提取缓冲液：称取 1.35 g 添加剂 1（见附录 A），置入玻璃烧杯中，加入 15 mL 1 mol/L NaOH（5.2.1），搅拌直至添加剂 1 溶解。将此溶液完全转移至 700 mL 1×致敏原提取缓冲液（7.1.1）中，在转移的过程中，要一直搅拌。使用 1 mol/L HCl（5.2.2），将 pH 值校正至 9，使用 1×致敏原提取缓冲液（7.1.1）定容到 750 mL，此溶液足够 45 个试样使用。可在室温（20℃~25℃）条件下保存 3 周，不可冷藏。若缓冲液中出现了晶体，则不可再使用。灰尘会导致晶体的析出，请在配置过程中使用洁净容器。

7.1.4 1×提取液 2：按照 1:2（1+1）稀释提取液 2 浓缩液（用水见附录 A）。稀释后

¹ RIDASCREEN® FAST Casein 是由 R-Biopharm 拜发公司提供的产品的商品名。给出这一信息是为了方便本标准的使用者，并不表示对该产品的认可。如果其他等效产品具有相同的效果，则可使用这些等效的产品。

全部的 1×提取液 2 足够用于 15 个试样，可在室温（20℃~25℃）条件下保存约 3 个月。

7.1.5 1×洗涤缓冲液：按照 1:10 比例稀释 10×洗涤缓冲液浓缩液（用水见附录 A），如移取 10 mL 10×洗涤缓冲液浓缩液（见附录 A），加 90 mL 水稀释混匀。稀释后的 1×洗涤缓冲液可贮室温（20℃~25℃）下保存 4 周。1 条微孔需约 15 mL 1×洗涤缓冲液洗涤。

7.1.6 1×酶标记物：用酶标记物缓冲液（见附录 A）按照 1:11 比例稀释试剂盒中 11×酶标记物浓缩液（见附录 A），临用现配。如移取 100 μL 11×酶标记物浓缩液（见附录 A），加 1 mL 酶标记物缓冲液（见附录 A）稀释混匀，足够 2 条微孔反应应用。

7.2 试样前处理和提取

对不少于 50 g 或 50 mL 试样进行充分均质。固态类试样粉碎、研磨、过筛（筛板孔径 0.3 mm~0.5 mm）；半固态食品试样匀浆混匀；液态试样振摇混合均匀。

7.2.1 使用 1×提取液 2（7.1.4）和含添加剂 1 的致敏原提取缓冲液（7.1.3）的方法（此样品提取液可直接用于检测 β-乳球蛋白及（全）奶过敏原）

针对固态及半固态试样，称取 1.00 g 均质试样置于洁净的 50 mL 离心管中，加入 4 mL 制备好的 1×提取液 2（7.1.4），盖上试管，用力上下颠倒混匀。在 100℃ 的水浴中加热 10 min，冷却，加入 16 mL 预热至 60℃ 的含添加剂 1 的致敏原提取缓冲液（7.1.3）。针对液态试样，取 1 mL 试样置于洁净的 50 mL 离心管中，加入 4 mL 制备好的 1×提取液 2（7.1.4），混合，在 100℃ 的水浴中加热 10 min，冷却，加入 15 mL 预热至 60℃ 的含添加剂 1 的致敏原提取缓冲液（7.1.3）。振荡均匀，在 60℃ 水浴中加热提取 10 min，用冰水快速冷却，置于冷冻离心机中在 4℃ 条件下以转速 4000 r/min 离心 10 min。有必要的可话可使用滤纸再次过滤，收集滤液。使用 1×致敏原提取缓冲液（7.1.1）对上清液/滤液进行 1:5 稀释（如 100 μL 试样提取液+400 μL 1×致敏原提取缓冲液（7.1.1）），此时试样的稀释倍数为 100 倍。制备好的试样溶液必须在 30 min 内进行检测。

7.2.2 针对玉米和玉米制品以及如核桃、葵花籽、松籽和南瓜籽试样

在试样提取前将含添加剂 1 的致敏原提取缓冲液（7.1.3）预热至 60℃，针对固态及半固态试样，称取出 1.00 g 试样置于洁净的空管中，加入 4 mL 稀释好的 1×提取液 2（7.1.4）和 16 mL 预热后的含添加剂 1 的致敏原提取缓冲液（7.1.3），充分混匀。若是针对液态试样，则取 1 mL 试样，加入 4 mL 稀释好的 1×提取液 2（7.1.4）和 15 mL 预热好的含添加剂 1 的致敏原提取缓冲液（7.1.3），充分混匀后，在 100℃ 水浴加热 10 min。用冰水快速冷却，置于冷冻离心机中在 4℃ 条件下以转速 4000 r/min 离心 10 min。有必要的可话可使用滤纸再次过滤，收集滤液。使用含牛血清白蛋白的致敏原提取缓冲液（7.1.2）对上清液进行 1:5 稀释（如 100 μL 试样提取液+400 μL 含牛血清白蛋白的致敏原提取缓冲液（7.1.2）），此时试样的稀释倍数为 100 倍。制备好的试样溶液必须在 30 min 内进行检测。

7.2.3 非水解的婴幼儿食品、冰淇淋、葡萄酒、巧克力、饮料、香肠、米饼等试样

在试样提取前将 1×致敏原提取缓冲液（7.1.1）预热至 60℃，针对固态及半固态试样，称取 1.00 g 试样置于干净的空管中，加入 20 mL 预热好的 1×致敏原提取缓冲液（7.1.1）；针对液态试样，则取 1 mL 试样加入 19 mL 预热好的 1×致敏原提取缓冲液（7.1.1）。（1 mL 葡萄酒也可以选择与 9 mL 预热好的 1×致敏原提取缓冲液（7.1.1）进

行混合提取，以提高检测灵敏度，此时试样的稀释倍数为10倍）。充分混匀后，60℃水浴加热提取10 min，用冰水快速冷却，置于冷冻离心机在4℃条件下以转速4000 r/min离心10 min。有必要的可使用滤纸再次过滤，收集滤液，此试样溶液累积稀释倍数为20倍。

7.4 测定

将预包被酪蛋白特异性抗体的微孔（见附录 A）插入微孔板架并做好标记，标准溶液标准溶液和试样均设置双平行。建议一次检测不要超过 3 条微孔板条（24 个板孔），以避免过大的孔间时间差造成对定量结果的不良影响。

在微孔中平行加入 100 μL 标准溶液 1~5（见附录 A）和试样，室温（20℃~25℃）孵育 10 min。孵育结束后，弃去微孔中的液体，每个微孔每次加入 250 μL 1×洗涤缓冲液（7.1.5）洗涤并在吸水纸上拍干，洗板 4 次。洗板结束后，每个微孔加入 100 μL 1×酶标记物（7.1.6），室温（20℃~25℃）孵育 10 min。孵育结束后，弃去微孔中的液体，每个微孔每次加入 250 μL 1×洗涤缓冲液（7.1.5）洗涤并在吸水纸上拍干，洗板 4 次。洗板结束后，每个微孔加入 100 μL 底物/发色剂（见附录 A），轻轻地水平摇动微孔板使其均匀混合，室温（20℃~25℃）暗处避光孵育 10 min。孵育结束后，加入 100 μL 终止液（见附录 A）至每个微孔，轻轻地水平摇动微孔板使其反应完全，在 450 nm 波长下 10 min 之内读取吸光度值（OD 值）。

7.5 标准曲线制作和测定结果计算

以标准溶液标准溶液 2~5 质量浓度为横坐标，平行测定的标准溶液平均 OD 值为纵坐标，绘制半对数曲线，计算试样液中酪蛋白浓度（C）。

可以使用试剂盒配套分析软件 RIDASOFT® Win 中 cubic spline 或 4P 模式进行标准曲线绘制和测定结果计算。

7.6 测定结果表述

固态或半固态试样中酪蛋白致敏原含量按式（1）计算：

$$X = \frac{C}{m \times 20} \times f \times V \quad \dots\dots\dots(1)$$

式中：

X ——试样中酪蛋白致敏原含量，单位为毫克每千克（mg/kg）；

C ——试样溶液中酪蛋白致敏原浓度，单位为毫克每升（mg/L）；

f ——试样稀释倍数；

V ——定容体积，为 0.02 L；

m ——试样称量的质量，单位为 kg；

20——标准溶液标准溶液浓度中包含的 20 倍稀释。

液态试样中酪蛋白含量按式（2）计算：

$$X = C \times f \quad \dots\dots\dots(2)$$

式中：

X ——试样中酪蛋白含量，单位为毫克每升（mg/L）；
 C ——试样溶液中酪蛋白浓度，单位为毫克每升（mg/L）；
 f ——试样稀释倍数。

注：1. 根据（7.2）制备的试样溶液时，其中的 20 倍稀释倍数已经包括在标准曲线中，试样稀释倍数 f 只考虑除此 20 倍以外的稀释倍数。

2. 计算结果保留小数点后两位有效数字。

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：

- 贮存在试剂瓶中的发色剂颜色出现蓝色；
- 加入终止液后标准溶液标准溶液 5（13.5 mg/L）的吸光度值 <1.2 。

8.2 变异系数

在重复性条件下获得的两次独立测定结果的绝对差值不大于算术平均值的 10%。

9 检出限和定量限

本方法，使用致敏原提取缓冲液时，酪蛋白的检出限为 0.12 mg/kg（L），定量限为 0.5 mg/kg（L）；

本方法，使用提取剂 2 时，酪蛋白的检出限为 0.71 mg/kg（L），定量限为 2.5 mg/kg（L）。

10 注意事项/防污染措施

10.1 防污染措施

10.1.1 食品试样的均质可能产生奶粉粉尘，为避免粉尘污染应尽量在独立的房间或使用通风橱进行试样均质的前处理操作。

10.1.2 设备和器具用水冲洗后，用 60% 乙醇或异丙醇彻底清洁，以消除粉尘污染。

10.1.3 在实验过程中必须戴手套操作，且在称量、均质试样，试样提取，及检测三个不同阶段中应更换新的手套。

10.2 试样 pH 值

极酸性或极碱性试样应调节 pH 值至 7.0 ± 0.5 后再检测。

附 录 A

(规范性)

酪蛋白酶联免疫吸附检测试剂盒

A.1 试剂盒组成

酪蛋白酶联免疫吸附检测试剂盒 RIDASCREEN® FAST Casein 包括：

- a) 预包被抗体的 96 孔可拆分微孔板：8×6 孔；
- b) 11×酶标记物浓缩液：0.7 mL/瓶×1 瓶；
- c) 酶标记物缓冲液：7 mL/瓶×1 瓶；
- d) 10×洗涤缓冲液浓缩液：100 mL/瓶×1 瓶；
- e) 10×致敏原提取缓冲浓缩液：100 mL/瓶×1 瓶；
- f) 2×提取液 2：30 mL/瓶×1 瓶；
- g) 添加剂 1：2g×1 瓶；
- h) 标准溶液标准溶液 1：1.3 mL/瓶×1 瓶，酪蛋白含量为 0 mg/L；
- i) 标准溶液标准溶液 2：1.3 mL/瓶×1 瓶，酪蛋白含量为 0.5 mg/L；
- j) 标准溶液标准溶液 3：1.3 mL/瓶×1 瓶，酪蛋白含量为 1.5 mg/L；
- k) 标准溶液标准溶液 4：1.3 mL/瓶×1 瓶，酪蛋白含量为 4.5 mg/L；
- l) 标准溶液标准溶液 5：1.3 mL/瓶×1 瓶，酪蛋白含量为 13.5 mg/L；
- m) 底物/发色剂：10 mL/瓶×1 瓶；
- n) 终止液：14 mL/瓶×1 瓶。

A.2 试剂盒验收和保存

- A. 2. 1 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。
- A. 2. 2 试剂盒于2℃~8℃ 黑暗处避光保存，使用前回复至室温（20℃~25℃）。
- A. 2. 3 不同批号试剂盒中组分不得混用。
- A. 2. 4 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。

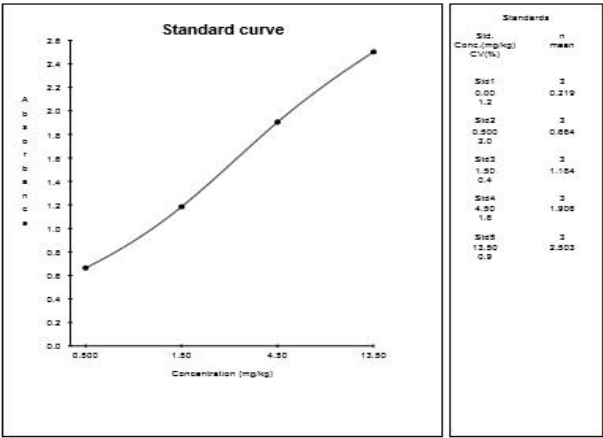


图 A.1 标准曲线谱图示例