

ICS 号:

CCS 号:

团 体 标 准

T/CIFST XXX.5—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 5 部分：大豆

Detection of food allergens in foods and during the food
production process using Immunoassay method

Part 5: Soya

(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 5 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 6 部分：大豆

1 范围

本部分规定了食品及食品生产过程中大豆致敏原（大豆蛋白）的酶联免疫吸附和免疫层析测定方法。

本部分适用于食品中大豆致敏原（大豆蛋白）酶联免疫吸附定量检测和免疫层析定性检测，也适用于食品生产过程中监控大豆致敏原（大豆蛋白）时对食品和环境采样及 CIP 清洁水进行的定量或定性检测。其中酶联免疫法适用于食品检测；免疫层析法适用于食品、环境采样和 CIP 清洁水检测。

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 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

大豆 soya

大豆通称黄豆，为豆科植物，其含有丰富的营养价值，是常见的致敏原。

第一法 酶联免疫吸附法

4 原理

标准溶液及试样中游离的大豆蛋白被微孔中预先包被的大豆蛋白特异性抗体捕获，形成抗原-抗体复合物。加入过氧化物酶标记抗体后，形成酶标记抗体-抗原-抗体夹心复合物。再次洗板后，加入底物/发色剂呈显色反应，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，大豆蛋白含量与吸光度值成正比，可得出试样中大豆蛋白含量。可根据大豆中大豆蛋白的百分比，计算出对应的试样里大豆的含量。

5 试剂和材料

5.1 RIDASCREEN® FAST Soya¹大豆致敏原酶联免疫吸附检测试剂盒

见附录 A。

5.2 食品中大豆致敏原提取试剂

除特别说明外，所有试剂均为分析纯或生化试剂，水为 GB/T 6682 规定的三级水。

5.2.1 酪蛋白（Casein）：Sigma C5890。

5.2.2 聚乙烯吡咯酮（PVP）K15 或 k17。

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 °C。

6.5 水浴锅：37°C，60°C，100°C。

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，将附录 A 中所有试剂回复至室温（20°C~25 °C），使用完尽快放置 2 °C~8 °C。试剂不可冷冻。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 °C~8 °C 保存。

7.1.1 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），稀释后的 1×洗涤缓冲液可贮于 2 °C~8 °C 下保存 4 周。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。1 条微孔需约 15 mL 1×洗涤缓冲液洗涤。

7.1.2 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 °C~8 °C 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°C 水浴中温育并摇晃混匀，直至结晶完全消失。

7.1.3 1×酶标记物：用水按照 1: 11 比例稀释 11×酶标记物浓缩液（用水见附录 A），现配现用。如移取 100 µL 11×酶标记物浓缩液（见附录 A），加 1 mL 水稀释混匀，足够 1 条微孔反应用。

7.2 试样前处理和提取

对不少于 50g 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。

¹ RIDASCREEN® FAST Soya 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。

7.2.1 固态或半固态试样：称取 1.00 g 均质试样，加入 2.5 mL 的提取液 3（见附录 A）和 17.5 mL 预热至 60 °C 的 1×致敏原提取缓冲液（7.1.2），按照 7.2.4 进一步处理试样。

7.2.2 液态试样：吸取 1 mL 均质试样加入 2.5 mL 提取液 3（见附录 A）和 16.5 mL 预热至 60 °C 的 1×致敏原提取缓冲液（7.1.2），按照 7.2.4 进一步处理试样。

7.2.3 含有单宁和多酚的食品，如调味品、巧克力、咖啡等：称取 1.00 g 均质试样，加入 2.5 mL 提取液 3（见附录 A）和 17.5 mL 含有 0.25% 的酪蛋白（5.2.1）和 1% 的 PVP（5.2.2）的预热到 60 °C 的 1×致敏原提取缓冲液（7.1.2），按照 7.2.4 进一步处理试样。

7.2.4 将按照 7.2.1/7.2.2/7.2.3 处理后的试样盖紧后涡旋混匀，然后置于 100 °C 水浴中孵育 10 min。盖紧后彻底混匀，然后置于 100 °C 水浴中孵育 10 min。用冰水快速冷却，再置冷冻离心机中在 4 °C 条件下以转速 4000 r/min 离心 10 min，取上清液 100 μL，加入 400 μL 1×致敏原提取缓冲液（7.1.2），漩涡混合均匀后进行检测，至此试样的稀释倍数累积为 100 倍。

7.3 测定

将预包被大豆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 的标准溶液 1~5（见附录 A）和试样，室温（20 °C~25 °C）孵育 10 min。孵育结束后，弃去微孔中液体，每个微孔每次加入 250 μL 1×洗涤缓冲液（7.1.1）洗涤并在吸水纸上拍干，洗板 3 次。洗板结束后，每个微孔加入 100 μL 1×酶标记物（7.1.3），室温（20 °C~25 °C）孵育 10 min。孵育结束后，弃去微孔中液体，每个微孔每次加入 250 μL 1×洗涤缓冲液（7.1.1）洗涤并在吸水纸上拍干，洗板 3 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 °C~25 °C）暗处避光孵育 10 min。孵育结束后，每个微孔加入 100 μL 终止液（见附录 A），轻轻地水平摇动微孔板使其反应完全，450 nm 波长下 10 min 之内读取吸光度值（OD 值）。

7.4 标准曲线制作和测定结果计算

以标准溶液 2~5 质量浓度为横坐标，平行测定的标准溶液的平均 OD 值为纵坐标，绘制半对数曲线，计算试样溶液中大豆致敏原蛋白浓度（C）。

可以使用配套分析软件 RIDASOFT® Win 中 cubic spline 模式进行标准曲线绘制和测定结果计算。

7.5 测定结果表述

固态或半固态试样中大豆蛋白含量按式（1）计算：

$$X = \frac{C}{m \times 100} \times f \times V \quad \dots\dots\dots(1)$$

式中：

X—— 试样中大豆蛋白含量，单位为毫克每千克（mg/kg）；

C—— 试样溶液中大豆蛋白浓度，单位为毫克每升（mg/L）；

f—— 试样稀释倍数；

V—— 定容体积，为 0.02 mL；

m—— 试样称量的量，单位为 kg；

100 —— 标准溶液浓度中包含的 100 倍稀释。

- 注： 1. 试样稀释倍数 f 为使用 $1\times$ 致敏原提取缓冲液稀释时的稀释倍数，为 5 倍，若进行了进一步稀释，则需考虑进去。
2. 计算结果保留小数点后两位有效数字。

液态试样中大豆蛋白含量按式（2）计算：

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

式中：

X ——试样中大豆蛋白含量，单位为毫克每升（mg/L）；

C ——试样溶液中大豆蛋白浓度，单位为毫克每升（mg/L）；

f ——试样稀释倍数。

- 注： 1. 根据（7.2）制备的试样溶液时的 100 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 100 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 5（20 mg/L）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

本方法对大豆蛋白的检出限为 0.24 mg/kg（L），定量限为 2.5 mg/kg（L）。

10 方法局限性

本方法与豆科菜豆属（菜豆、绿豆等）和蚕豆属（蚕豆等）有交叉反应，与豌豆和花生有微弱的交叉反应。建议可采用第二法对试样进行初筛，对阳性试样再以此法进行定量检测。

11 注意事项/防污染措施

11.1 防污染措施

11.1.1 食品试样的均质可能产生粉尘，为避免粉尘级别的蛋白（食品致敏原）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。

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

11.1.3 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，及试剂盒检测三个不同阶段中应更换新的手套。

第二法 免疫层析法

12 原理

试样中的大豆蛋白与酶标记抗体发生反应，形成抗原-抗体结合物。此抗原-抗体结合物被包被在免疫层析试纸条上的特异性抗体捕获，形成抗体-抗原-抗体的夹心复合物，并在检测区显色，通过目测判读检测结果。

13 试剂和材料

13.1 RIDA®QUICK Soya²大豆致敏原免疫层析检测试剂盒

见附录 B。

14 仪器和设备

14.1 分析天平：感量 0.01g。

14.2 粉碎机。

14.3 涡旋混匀仪。

14.4 水浴锅：100℃。

14.5 单道移液器：100 μL~1000 μL，500 μL~5000 μL。

15 分析步骤

15.1 环境拭子的采样

15.1.1 吸取 750 μL 的试样提取缓冲液（见附录 B）到 2 mL 反应管（见附录 B）中，浸润棉签拭子（见附录 B）。

15.1.2 用浸润的棉签拭子的棉头充分擦拭 10 cm×10 cm 的待检测环境表面。

15.1.3 将擦拭取样后的棉签拭子放回装有试样缓冲液的反应管中，充分浸洗并挤压释放出棉签拭子采样棉头上采集的试样（液）后，折断棉签拭子，使棉签拭子头可以完全置于 2 mL 反应管（见附录 B）中。

15.1.4 盖上 2 mL 反应管盖，并置于容器上 100 °C 水浴加热 5 min。

15.1.5 加热后，试样静置冷却至室温（20℃~25 °C）。

15.1.6 取 150 μL 样液用于检测。

15.2 食品试样前处理和提取

15.2.1 若为液态试样：对不少于 5 mL 试样进行充分均质后，取 1 mL 均质试样。若为固态试样：粉碎 5.00 g 试样并充分均质后，称取 1.00 g 试样。

15.2.2 向其中加入 7.5 mL 的试样提取缓冲液（见附录 B），漩涡混合均匀。

² RIDA® QUICK Soya 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。

15.2.3 将混合好的试样，100 °C 水浴加热 10 min。

15.2.4 加热后，试样冷却至室温（20°C~25 °C）。

15.2.5 过滤试样液。

15.2.6 取 150 µL 上清液用于检测。

15.3 CIP 清洁水

15.3.1 取 1 支 2 ml 反应管，加入 100 µL CIP 清洁水和 750 µL 试样提取缓冲液，涡旋混合。

15.3.2 盖上 2 mL 反应管盖，并置于容器上 100 °C 水浴加热 5 min。

15.3.3 加热后，试样静置冷却至室温（20 °C~25 °C）。

15.3.4 取 150 µL 样液用于检测。

15.4 试样的检测

取新的 5 mL 测试管（见附录 B），加入 5 滴酶标记物 1（见附录 B）和 5 滴酶标记物 2（见附录 B），加入 150 µL 按照 14.1/14.2/14.3 处理的试样，混合均匀，室温（20°C~25 °C）孵育 5 min。戴上手套，取一支大豆致敏原快速检测条（见附录 B）顺着箭头朝下的方向垂直放入 5 mL 测试管（见附录 B）中，页面不能超过最高线，室温（20°C~25 °C）孵育 5 min 后，取出大豆致敏原快速检测条，与结果评估卡进行比对和结果分析。

15.5 检测结果表述

试纸条同时出现质控带和检测带，检测结果为阳性。

试纸条只出现质控带，未出现检测带，检测结果为阴性。

注：如果被检测的试样中含有过高浓度的大豆（例如 12000 mg/kg 大豆蛋白），则可能会因为“钩状效应”而产生假阴性的结果。在此情况下需要对试样进行一系列的阶梯型稀释后再重新检测。

16 质量控制

16.1 试剂失效

试纸条未出现质控带，检测结果无效。

16.2 内部质控

定期或必要时使用商品化加工食品大豆致敏原质控物或实验室自行制备的人工添加试样进行质量控制。

17 检出限

本方法对大豆致敏原的检出限为：针对环境表面采样为 0.5 µg 大豆蛋白/100 cm²。

本方法针对未经加工的非加工食品基质（如小麦粉）中的大豆粉的检出限为 0.5 mg/kg（L）大豆蛋白。

本方法针对加工食品的检出限为 10 mg/kg（L）大豆蛋白。

本方法针对不含清洁剂的 CIP 清洁水的检出限为 0.5 mg/L，针对有酸性清洁剂、中性清洁剂、烷基二甲基苯甲基铵氯(Mikro-Quat)的清洁剂的 CIP 清洁水的检出限为 2 mg/L。

18 方法局限性

如果被检测的试样中含有过高浓度的大豆蛋白 ($\geq 12000 \text{ mg/kg}$)，则检测带的颜色可能会变浅，甚至完全抑制其形成。若试样可能含有特别高浓度的目标检测过敏原，则建议对试样进行大倍数稀释。

19 注意事项/防污染措施

19.1 防污染措施

按照 10.1。

19.2 试样 pH 值

强酸性或强碱性试样应调节 pH 值至 7.5 ± 0.5 后再检测。

附 录 A

(规范性)

大豆致敏原酶联免疫吸附检测试剂盒

A.1 试剂盒组成

大豆致敏原酶联免疫吸附检测试剂盒 RIDASCREEN®FAST Soya 包括:

- a) 预包被大豆蛋白特异性抗体的 48 孔可拆分微孔板: 8×6 孔;
- b) 11×酶标记物: 0.7 mL/瓶×1 瓶;
- c) 10×洗涤缓冲液浓缩液: 100 mL/瓶×1 瓶;
- d) 10×致敏原提取缓冲液浓缩液: 100 mL/瓶×1 瓶;
- e) 1×提取液 3: 30 mL/瓶×4 瓶
- f) 标准溶液 1: 1.3 mL/瓶×1 瓶, 大豆蛋白含量为 0.0 mg/L;
- g) 标准溶液 2: 1.3 mL/瓶×1 瓶, 大豆蛋白含量为 2.5 mg/L;
- h) 标准溶液 3: 1.3 mL/瓶×1 瓶, 大豆蛋白含量为 5.0 mg/L;
- i) 标准溶液 4: 1.3 mL/瓶×1 瓶, 大豆蛋白含量为 10.0 mg/L;
- j) 标准溶液 5: 1.3 mL/瓶×1 瓶, 大豆蛋白含量为 20.0 mg/L;
- k) 底物/发色剂: 10 mL/瓶×1 瓶;
- l) 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。

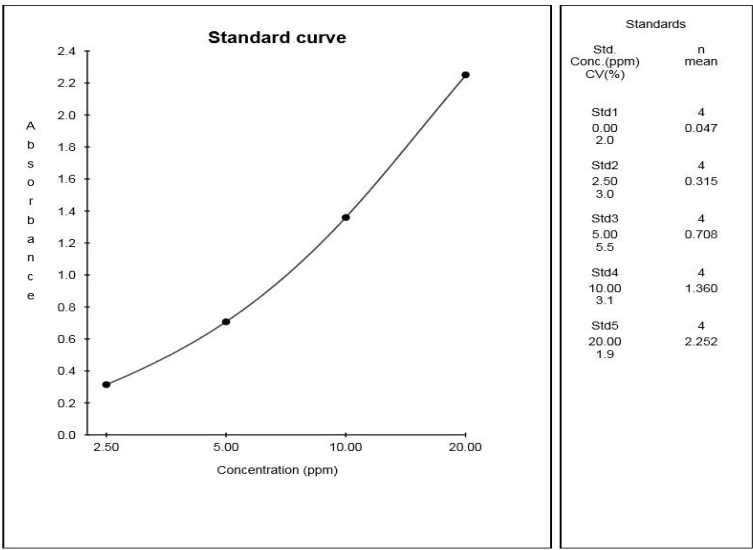


图 A.1 标准曲线谱图示例

附 录 B

(规范性)

大豆致敏原免疫层析检测试剂盒

B.1 试剂盒组成

大豆致敏原免疫层析检测试剂盒 RIDA® QUICK Soya 包括:

- a) 大豆致敏原快速检测条: 25 支;
- b) 即用型试样提取缓冲液: 20 mL/瓶×1 瓶;
- c) 酶标记物 1: 4 mL/瓶×1 瓶;
- d) 酶标记物 2: 4 mL/瓶×1 瓶;
- e) 反应管: 2 mL×25 支;
- f) 测试管: 5 mL×30 支;
- g) 涂抹拭子: 26 支;
- h) 移液枪枪头: 50 支;
- i) 结果评估卡: 1 片。

B.2 试剂盒验收和保存

B.2.1 每个批号试剂盒应按照质量控制要求进行验收试验, 考察检测性能。

B.2.2 未开封试剂盒保存在 2 °C~8 °C, 使用前回复至室温 (20°C~25 °C)。开封后试剂条保存在室温 (20°C~25 °C) 并保持干燥。

B.2.3 超过有效期的试剂盒不得使用。