

ICS 号:

CCS 号:

# 团 体 标 准

T/CIFST XXX.8—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 8 部分： $\beta$ -乳球蛋白

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

Part 8:  $\beta$ -Lactoglobulin

(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： $\beta$ -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 8 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免疫分析检测方法

## 第 8 部分： $\beta$ -乳球蛋白

### 1 范围

本部分规定了食品及食品生产过程中 $\beta$ -乳球蛋白致敏原的酶联免疫吸附测定方法。

本部分适用于食品及食品生产过程中 $\beta$ -乳球蛋白的酶联免疫吸附定量检测。其中，夹心酶联免疫吸附法适用于未经水解的食品，竞争酶联免疫吸附法适用于经过水解的食品。

### 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

$\beta$ -乳球蛋白  $\beta$ -Lactoglobulin

$\beta$ -乳球蛋白是奶中的一种主要的蛋白质，约占总蛋白的 10%，具有强致敏性，尤其对于婴儿。

### 第一法 夹心酶联免疫吸附法

### 4 原理

标准溶液及未经水解的食品中游离的 $\beta$ -乳球蛋白被微孔中预先包被的抗体捕获，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。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， $\beta$ -乳球蛋白致敏原含量与吸光度值成正比，可得出试样中 $\beta$ -乳球蛋白致敏原含量。

### 5 试剂和材料

## 5.1 RIDASCREEN® FAST $\beta$ -Lactoglobulin<sup>1</sup> $\beta$ -乳球蛋白夹心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，水为 GB/T 6682 规定的三级水。

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 1L，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 (BSA) (Serva, 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 0.001 g。

6.3 旋涡混匀仪。

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  $\mu$ L~200  $\mu$ L，100  $\mu$ L~1000  $\mu$ L。

6.7 八道移液器：30  $\mu$ L~300  $\mu$ L。

## 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)，使用完尽快放回 2 °C~8 °C，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 $\times$ 致敏原提取缓冲液：按照 1:10 比例稀释 10 $\times$ 致敏原提取缓冲液浓缩液（用水见附录 A），稀释后的 1 $\times$ 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 $\times$ 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 水浴中温育并摇动混匀，直至结晶完全消失。

7.1.2 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 $\times$ 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 $\times$ 致敏原提取缓冲液 (7.1.1) 定容到 750 mL，这些溶液足够 45 个试样使用，可在室温 (20 °C~25 °C) 条件下保存 3 周，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。

7.1.3 1 $\times$ 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）。稀释后全部的 1 $\times$ 提取液 2 足够用于 15 个试样，可在室温 (20 °C~25 °C) 条件下保存约 3 个月。

<sup>1</sup> RIDASCREEN® FAST  $\beta$ -Lactoglobulin 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。

**7.1.4 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×洗涤缓冲液可贮室温（20℃~25℃）下保存 4 周。如移取 10 mL 10×洗涤缓冲液浓缩液（见附录 A），用 90 mL 水稀释混匀。1 条微孔需约 15 mL 1×洗涤缓冲液洗涤。

## 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 固态或半固态试样

称取 1.00 g 均质试样于洁净的 50 mL 离心管中（若为松籽试样，则再称取并加入 0.50 g 牛血清白蛋白（5.2.3），加入 4 mL 制备好的 1×提取液 2（7.1.3），盖好管盖后用力上下颠倒混匀。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（7.1.2）。按照 7.2.3 进一步处理试样。

### 7.2.2 液态试样

取 1 mL 试样于洁净的 50 mL 具塞离心管中，加入 4 mL 制备好的 1×提取液 2（7.1.3），盖上试管盖，盖好管盖后用力上下颠倒混匀。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（7.1.2）。按照 7.2.3 进一步处理试样。

**7.2.3** 将经过 7.2.1 或 7.2.2 处理的试样上下颠倒剧烈混匀，在 60℃ 水浴提取 10 min，用冰水快速冷却，置冷冻离心机中在 4℃ 条件下以转速 4000 r/min 离心 10 min 或过滤。用 1×致敏原提取缓冲液（7.1.1）对上清液/滤清液进行 5 倍稀释，得到用于测定的试样液，至此试样的稀释倍数累计为 100 倍。制备好的试样溶液必须在 30min 内进行检测。

## 7.3 测定

将预包被β-乳球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℃~25℃）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（7.1.4）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 的酶标记物（见附录 A），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（7.1.4）洗涤并在吸水纸上拍干，洗板 3 次。洗板结束后，每个微孔分别加入 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，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，在 450 nm 波长下 10 min 之内读取吸光度值（OD 值）。

## 8 结果计算

### 8.1 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，计算试样液中β-乳球蛋白浓度（C）。

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

## 8.2 测定结果表述

固态试样中β-乳球蛋白致敏原含量按式（1）计算：

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

式中：

$X$ ——试样中β-乳球蛋白致敏原含量，单位为毫克每千克（mg/kg）；

$C$ ——试样溶液中β-乳球蛋白致敏原浓度，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；

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×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β-乳球蛋白含量按式（1）计算：

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

式中：

$X$ ——试样中β-乳球蛋白含量，单位为毫克每升（mg/L）；

$C$ ——试样溶液中β-乳球蛋白浓度，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。

## 9 质量控制

### 9.1 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（4.5 mg/L）吸光度值 <1.2。

### 9.2 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%。

## 10 检出限和定量限

本方法对β-乳球蛋白的检出限为 0.04 mg/kg（L），定量限为 0.167 mg/kg（L）。

## 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。

### 11.2 试样 pH 值

极酸性或极碱性试样应调节 pH 值至  $7.0 \pm 0.5$  后再检测。

## 第二法 竞争酶联免疫吸附法

## 12 原理

标准溶液及经过水解的试样溶液中的  $\beta$ -乳球蛋白与微孔板中预先包被的  $\beta$ -乳球蛋白竞争结合抗体。洗板后，加入过氧化物酶标记的二级抗体，与固定的  $\beta$ -乳球蛋白抗体结合。再次洗板后，加入底物和发色剂呈显色反应。通过测定 450 nm 波长下吸光度值， $\beta$ -乳球蛋白含量与吸光度值成反比，可得出试样中  $\beta$ -乳球蛋白含量。

## 13 试剂和材料

### 13.1 RIDASCREEN® $\beta$ -Lactoglobulin<sup>2</sup> $\beta$ -乳球蛋白竞争酶联免疫吸附检测试剂盒

参见附录 B。

## 14 仪器和设备

14.1 酶标仪：450 nm。

14.2 分析天平：感量 0.01 g。

14.3 涡旋混匀仪。

14.4 振荡器。

14.5 单道移液器：20  $\mu$ L~200  $\mu$ L，100  $\mu$ L~1000  $\mu$ L

14.6 八道移液器：30  $\mu$ L~300  $\mu$ L。

## 15 分析步骤

### 15.1 试剂配制

<sup>2</sup> RIDASCREEN® $\beta$ -Lactoglobulin 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。

试剂配制前,将附录B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。

**15.1.1 1×缓冲液:**按照1:10比例稀释10×缓冲液浓缩液(用水见附录B),稀释后的1×缓冲液可贮室温(20℃~25℃)下保存4周。如移取10 mL 10×缓冲液浓缩液(见附录B),加90 mL水稀释混匀。1条微孔需约15 mL 1×缓冲液。该缓冲液既是洗涤缓冲液可用于洗板,也是稀释缓冲液用于试样和抗体的稀释。

**15.1.2 1×抗体:**用1×缓冲液(15.1.1)按照1:11比例稀释11×抗体浓缩液(见附录B),临用现配。如移取100 μL 11×抗体浓缩液(见附录B),加1 mL 1×缓冲液稀释混匀,足够2条微孔反应应用。

## 15.2 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。

称取2.00 g均质好的试样于离心管中,加入水至50 mL,在室温(20℃~25℃)条件下涡旋振荡10 min,提取液按1:20的比例用1×缓冲液(15.1.1)稀释(例如:50 μL试样+950 μL 1×缓冲液)。此时试样的稀释倍数为500倍。

## 15.3 测定

将预包被β-乳球蛋白的微孔(见附录B)插入微孔板架并做好标记,微孔数量包括标准溶液和试样,均设置双平行。

在微孔中平行加入50 μL标准溶液1~6(见附录B)和试样,再加入50 μL 1×抗体,轻轻地水平摇动微孔板使其均匀混合,室温(20℃~25℃)孵育2 h。孵育结束后,弃去微孔中液体,每个微孔每次加入250 μL 1×缓冲液(15.1.1)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酶连接物(见附录B),孵育30 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×缓冲液(15.1.1)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50 μL底物(见附录B)和50 μL发色剂(见附录B),室温(20℃~25℃)暗处孵育15 min。孵育结束后,每个微孔加入100 μL终止液(见附录B),轻轻地水平摇动微孔板使其反应完全,在450 nm波长下立即读取吸光度值(OD值)。

## 15.4 标准曲线制作和测定结果计算

以标准溶液2~6质量浓度为横坐标,式(3)计算的百分比为纵坐标,绘制半对数曲线,计算试样液中β-乳球蛋白浓度(C)。

β-乳球蛋白标准溶液和试样液的百分比吸光度值按式(3)计算:

$$A = \frac{S}{S_0} \times 100\% \quad \dots\dots\dots (3)$$

式中:

A——百分比吸光度值;

S——β-乳球蛋白标准溶液或试样液的平均吸光度值;

S<sub>0</sub>——标准溶液1的平均吸光度值。

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

## 15.5 测定结果表述



固态或半固态试样中 $\beta$ -乳球蛋白含量按式（4）计算：

$$X = \frac{C}{m \times 1000} \times f \times V \quad \dots\dots\dots(4)$$

式中：

$X$ ——试样中 $\beta$ -乳球蛋白含量，单位为毫克每千克（mg/kg）；

$C$ ——试样溶液中 $\beta$ -乳球蛋白浓度，单位为纳克每毫升（ng/mL）；

$f$ ——试样稀释倍数；

$V$ ——定容体积，为 50 mL；

$m$ ——试样称量的质量，单位为 g；

1000——单位换算系数。

注意：1. 试样稀释倍数应为使用 1×缓冲液稀释上清液或滤液的稀释倍数 20 倍，若除此稀释步骤外还有进一步稀释，也需要考虑进去。

2. 计算结果保留小数点后两位有效数字。

液态试样中 $\beta$ -乳球蛋白含量按式（5）计算：

$$X = C \times f / 1000 \quad \dots\dots\dots(5)$$

式中：

$X$ ——试样中 $\beta$ -乳球蛋白含量，单位为毫克每升（mg/L）；

$C$ ——试样溶液中 $\beta$ -乳球蛋白浓度，单位为纳克每毫升（ng/mL）；

$f$ ——试样稀释倍数。

1000——单位换算系数。

注意：1. 此处试样稀释倍数为 500 倍。

2. 计算结果保留小数点后两位有效数字。

## 16 质量控制

### 16.1 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 1（0 ng/mL）吸光度值 $<0.8$ 。

### 16.2 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%。

## 17 检出限和定量限

本方法对 $\beta$ -乳球蛋白的检出限为 2.1 mg/kg（L），定量限为 5 mg/kg（L）。

18 注意事项/防污染措施

防污染措施按照 11.1。

附录 A

(规范性)

β-乳球蛋白夹心酶联免疫吸附检测试剂盒

A.1 试剂盒组成

β-乳球蛋白夹心酶联免疫吸附检测试剂盒 RIDASCREEN®FAST β-Lactoglobulin 包括:

- a) 预包被β-乳球蛋白抗体的 48 孔可拆分微孔板: 8×6 孔;
- b) 酶标记物液: 6 mL/瓶×1 瓶;
- c) 10×洗涤缓冲液浓缩液: 100 mL/瓶×1 瓶;
- d) 10×过敏原提取缓冲浓缩液: 100 mL/瓶×1 瓶;
- e) 2×提取液 2: 30 mL/瓶×3 瓶;
- f) 标准溶液 1: 1.3 mL/瓶×1 瓶, β-乳球蛋白含量为 0 mg/L;
- g) 标准溶液 2: 1.3 mL/瓶×1 瓶, β-乳球蛋白含量为 0.167 mg/L;
- h) 标准溶液 3: 1.3 mL/瓶×1 瓶, β-乳球蛋白含量为 0.5 mg/L;
- i) 标准溶液 4: 1.3 mL/瓶×1 瓶, β-乳球蛋白含量为 1.5 mg/L;
- j) 标准溶液 5: 1.3 mL/瓶×1 瓶, β-乳球蛋白含量为 4.5 mg/L;
- k) 添加剂 1: 2g/瓶×1 瓶;
- l) 底物/发色剂: 10 mL/瓶×1 瓶;
- m) 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。

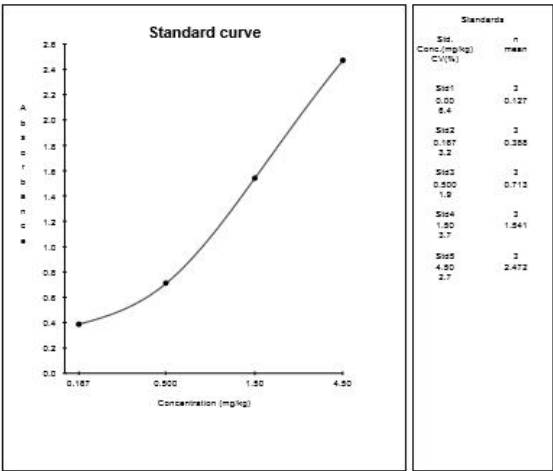


图 A.1 标准曲线谱图示例

附 录 B

(规范性)

β-乳球蛋白竞争酶联免疫吸附检测试剂盒

B.1 试剂盒组成

β-乳球蛋白竞争酶联免疫吸附检测试剂盒 RIDASCREEN®β-Lactoglobulin 包括：

- a) 预包被β-乳球蛋白的 96 孔可拆分微孔板：8×12 孔；
- b) 酶标记物液：12mL/瓶×1 瓶；
- c) 11×抗体浓缩液：1 mL/瓶×1 瓶；
- d) 10×缓冲液浓缩液：100 mL/瓶×1 瓶；
- e) 标准溶液 1：1.3 mL/瓶×1 瓶，β-乳球蛋白含量为 0 ng/mL；
- f) 标准溶液 2：1.3 mL/瓶×1 瓶，β-乳球蛋白含量为 10 ng/mL；
- g) 标准溶液 3：1.3 mL/瓶×1 瓶，β-乳球蛋白含量为 30 ng/mL；
- h) 标准溶液 4：1.3 mL/瓶×1 瓶，β-乳球蛋白含量为 90 ng/mL；
- i) 标准溶液 5：1.3 mL/瓶×1 瓶，β-乳球蛋白含量为 270 ng/mL；
- j) 标准溶液 6：1.3 mL/瓶×1 瓶，β-乳球蛋白含量为 810 ng/mL；
- k) 底物：7 mL/瓶×1 瓶；
- l) 发色剂：7 mL/瓶×1 瓶；
- m) 终止液：14 mL/瓶×1 瓶。

B.2 试剂盒验收和保存

- B.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。
- B.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℃）。
- B.2.3 不同批号试剂盒中组分不得混用。
- B.2.4 超过有效期的试剂盒不得使用。

B.3 标准曲线谱图

标准曲线谱图示例见图 B.1。

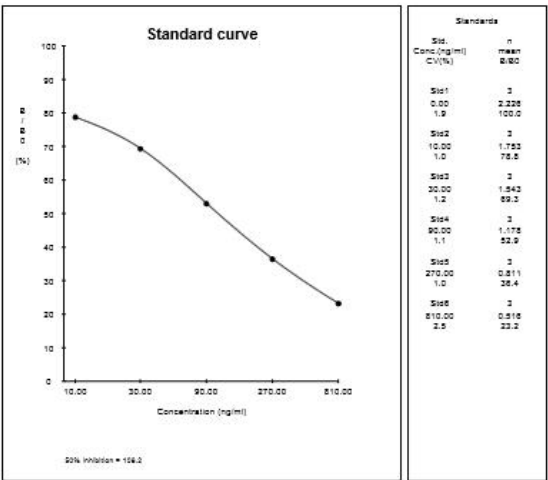


图 B.1 标准曲线谱图示例