

# 大豆过敏原

## 检测说明书

### 食品中大豆过敏原的定量酶免疫检测试剂盒

以大豆胰蛋白酶抑制因子计	16ppb
回收率	77-106%
孵育时间	60 分钟

#### 大豆过敏原

大豆属于豆类，豆科植物种子含有高达 39% 的蛋白质。很多蛋白具有致敏性，例如 Gly M1，大豆球蛋白，Kunitz 胰蛋白酶抑制因子和 Gly m4 已知与桦树花粉 Bet v1 过敏原存在交叉反应性。因此，大豆是一个重要的食物过敏原。食物中潜在的大豆过敏原对大豆过敏的人而言是一个严重问题。微量的大豆可引起过敏反应，严重会导致过敏性休克。大豆过敏的人必须严格避免大豆或含大豆的食物。在一些食物中大豆作为添加剂，没有被标记出来。这样在生产过程中可能存在交叉污染，如巧克力的生产过程是一个代表性的例子。因此，对食品成品的准确检测会更好确定其是否含有大豆残留。只有很少一部分大豆在加工过程（如高温）中保持稳定，所以检测其中稳定的过敏蛋白是很好的方法，而大豆胰蛋白酶抑制因子（STI）就是这种稳定的过敏蛋白。

欧陆分析基于检测 STI 的大豆快检试剂盒是一种灵敏度高，专门性强的定量分析试剂盒，广泛应用于饼干、粮食、冰淇淋和巧克力、速溶汤料和香肠食品中大豆过敏原的检测。

### **检测原理**

该产品基于酶联免疫检测的原理。微孔板内包被抗体能直接捕获 STI。样品经过提取后的待测液，连同标准品系列加入到包被有抗体的微孔中进行孵育。室温孵育 20 分钟后，用蒸馏水清洗掉未结合的残留物，加入酶标记的第二抗体，形成双抗体夹心结构。再次清洗后，加入底物，与酶复合物形成蓝色。加入终止液溶液变为黄色。大豆含量和显色浓度成正比。

### **注意事项**

完全遵守良好实验室操作规范，将会得到更可靠的检测结果：

1. 检测开始前，使所有试剂回复至室温。
2. 使用前轻摇或倒置试剂使试剂均匀，不要产生泡沫。
3. 检测开始后，按照操作步骤的顺序和时间，中途不要停顿。
4. 试剂使用后用各自的盖子封好，不要相互交叉。
5. 每个不同样本更换一次性吸头以免交叉污染。
6. 所有样本和标准品应同时进行操作，以确保测试条件一致。
7. 不同批次的试剂盒不要混用。
8. 不要使用过期的试剂。
9. 检定实验室设备（移液器，酶标仪等）的精度和准确性。

### **安全说明**

1. 实验室不要吸烟、饮食和用嘴吸取液体。
2. 处理危险样本时带上一一次性手套。
3. 避免底物和终止液皮肤和口鼻（可能会有刺激、灼烧或毒性危害）。一旦接触，用大量的水冲洗。
4. 按照良好实验室规范处理使用过的化学物质。

### **试剂盒提供材料**

试剂盒含有 96/48 次检测。保存条件为 2-8℃。瓶子上和外包装注有有效期。

1. 微孔板含有 12/6 条每条 8 孔抗体微孔
2. 大豆 STI 标准品 (0,40,100,400 和 1000ppb)：每瓶 2.0mL，共 5 瓶，红色，即用。

3. 酶结合物：15/7.5mL，标记为红色，即用。
4. 底物（TMB）：15mL，即用。
5. 终止液（0.5M 硫酸）：15mL，即用。
6. 提取和稀释缓冲液（Tris）：2/1\*120mL 的 10 倍浓缩液，标记为红色，和蒸馏水按 1+9 稀释后使用。稀释后 4C°下可至少保存 1 周，冷冻后如有结晶要在 37C°下回温 15 分钟。
7. 浓缩清洗液（PBS-Tween20）：60mL 的 10 倍浓缩液，和蒸馏水按 1+9 稀释后使用。稀释后 4C°下可至少保存 4 周，冷冻后如有结晶要在 37C°回温 15 分钟。
8. 未使用的微孔保存在塑料袋。
9. 操作说明书。

#### **其它未提供的材料**

1. 移液器,100  $\mu$ L
2. 量筒和天平
3. 混匀器
4. 水浴摇床
5. 离心机
6. 酶标仪(450nm)
7. 蒸馏水

#### **样品准备**

为了避免交叉污染，所有使用的容器必须彻底清洗干净，因为大豆蛋白可能会牢固附着在某些容器表面。为避免交叉污染，强烈建议注意清洗顺序。以下样品制备适用于各种样品。

1. 在混匀有代表性的样品中抽取至少 5g 磨碎的粉末样品。
2. 取适量浓缩提取液，稀释 10 倍。
3. 1g 均匀样品中加入 20mL 预稀释的提取液，60C°水浴 15 分钟，期间每 2 分钟摇晃以确保提取均匀。
4. 样品液 2000g 离心 10 分钟，如果有悬浮物，过滤。
5. 每孔用 100 $\mu$ L 清液。如果结果超出检测范围，稀释后重测。

检测步骤

取适量浓缩清洗液，和蒸馏水 1+9 的比例稀释 10 倍。标准品在样品前后各加 1 次，用平均值进行计算。考虑良好实验室规范和质控，建议样品做 2 重复。过程如下：

- 1. 如前述准备好提取的样品。
- 2. 取出适量微孔，分别加入 100μL 标准品和样品。
- 3. 室温孵育 20 分钟。
- 4. 倒掉微孔中的液体。将清洗液加满每个微孔，清洗后倒掉。重复清洗 3 次，然后将微孔倒置并在吸水纸巾上拍干，确保微孔中无液体残留。
- 5. 吸取 100μL 酶结合物到每个微孔中。
- 6. 室温孵育 20 分钟。
- 7. 按步骤 4 重复清洗微孔。
- 8. 吸取 100μL 底物到每个微孔中。
- 9. 室温避光（抽屉里）孵育 20 分钟。
- 10. 吸取 100μL 终止液到每个微孔中。
- 11. 混匀后在 450nm 波长下读取吸光值，并输入表格计算结果。

结果表示

检测结果以 XXXppb 的 STI 含量表示，可以乘以转换因子表示为以下形式：

大豆粉	42
大豆粉，烘烤	470
大豆分离蛋白（90%）	864
豆奶	2500
大豆组织（粒状）	3080
豆腐	50000

曲线标准值

下表是典型标准曲线参考值。结合比例以 1000ppb 的标准吸光值为 100%基准。这些数据仅作为示例，不能替代每次测定实验。

STI 含量/ppb	1000ppb 的结合比率/%
1000	100
400	76
100	36
40	19
0	7

性能

灵敏度

该试剂盒的检出限(LOD)为 16ppb STI，定量低限(LOQ)为 40ppb STI。

由于样品基质和空白的影响，检测结果低于定量低限可视为阴性。

交叉反应性

本试剂盒与以下产品无交叉反应。

Adzuki bean 红豆	Cow's milk 牛奶	Onion 洋葱
Almond 杏仁	Crab, cooked 熟螃蟹	Paprika 辣椒粉
Barley 大麦	Crab, raw 生螃蟹	Pea 豌豆
Bean, white 白豆	Cress 水芹	Peanut 花生
Beef 牛肉	Cumin 小茴香	Pecan 美洲山核桃
Bovine gelatin 牛明胶	Duck 鸭肉	Pepper 胡椒
Brazil nut 巴西坚果	Egg 鸡蛋	Pine seed 松子
Buckwheat 荞麦	Ewe's milk 绵羊奶	Pistachio 开心果
Caraway 香菜	Fenugreek 葫芦巴	Plum 李子
Carrot 胡萝卜	Fish gelatin 鱼胶	Poppy seed 罂粟籽
Cashew 腰果	Gliadin 麸朊	Pork 猪肉
Cayenne 花椒	Goat's milk 山羊奶	Potato 马铃薯
Celery 芹菜	Guar gum 瓜尔豆胶	Pumpkin seed 南瓜子
Cherry 樱桃	Hazelnut 榛子	Rice 大米
Chervil 山萝卜	Isinglass 明胶	Rye 黑麦
Chestnut 栗子	Kidney bean 菜豆	Saccharose 蔗糖
Chia 鼠尾草	Kiwi 猕猴桃	Sesame 芝麻
Chicken 鸡肉	Lamb 羊肉	Shrimp, cooked 熟虾
Chickpea 鹰嘴豆	Lentil 兵豆	Shrimp, raw 生虾
Chili 红椒	Lupin 羽扇豆	Sunflower seeds 葵花籽
Cocoa 可可	Macadamia 夏威夷果	Tomato 西红柿
Coconut 椰子	Mustard 芥末	Turkey 火鸡
Cod 鳕鱼	Nutmeg 肉豆蔻	Walnut 胡桃
Corn 玉米	Oats 燕麦	Wheat 小麦

精度

批内稳定性	6-8%
批间稳定性	5-13%
日间稳定性	3-11%

线性

加标样品（曲奇饼干、谷物、冰淇淋和巧克力）系列浓度的结果在 81-114%。

回收率

不同样品中进行大豆加标，测定平均回收率如下：

曲奇饼干	106%
谷物	100%
冰淇淋	77%
巧克力	77%
速溶汤料	90%
香肠	96%