

# 甲壳动物过敏原

## 检测说明书

### 食品中甲壳动物过敏原的定量酶免疫检测试剂盒

灵敏度	0.9ppb
回收率	84-97%
孵育时间	60 分钟

#### 甲壳动物过敏原

甲壳动物过敏原与螨虫有交叉反应，也是最重要的过敏原之一。就这一点来说，普遍存在于甲壳动物的原肌球蛋白是一种重要的过敏蛋白。在煮熟的甲壳动物提取物总蛋白中占比 20%左右。食品中潜在的甲壳动物过敏原引起过敏人群产生严重问题。极微量甲壳动物过敏原即可引起严重的过敏反应，甚至可能导致过敏性休克。因此，过敏患者一定要避免摄食含甲壳动物过敏原的食物。生产中的交叉污染也要特别防范。食品中的甲壳动物过敏原的检测是必不可少的，因此，准确检测成品中的甲壳动物过敏原是有必要的。

欧陆分析甲壳动物过敏原（原肌球蛋白）快检试剂盒是一种灵敏度高，专门性强的定量分析试剂盒，广泛应用于鱼制品、汤料、调味料、面制品和肉制品中原肌球蛋白（来源于印度对虾）和甲壳动物过敏原的检测。

## 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甲壳动物蛋白。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，用清洗液清洗掉未结合的残留物，加入酶标记的第二抗体，与甲壳动物蛋白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。甲壳动物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. 原肌球蛋白标准品（0,20,60,200 和 400ppb）：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. 塑料袋用于保存未使用的微孔。
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
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, 因为甲壳动物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**

取适量的浓缩清洗液, 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。具体过程如下:

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 的原肌球蛋白含量表示，可以乘以转换因子表示为以下形式：

Black tiger prawns, raw 生黑虎虾	60
Black tiger prawns, cooked 熟黑虎虾	260
Lobster, raw 生龙虾	290
Lobster, cooked 熟龙虾	270
Crawfish, raw 生小龙虾	50
Crawfish, cooked 熟小龙虾	490
Spiny lobster, raw 生大螯虾	8620
Spiny lobster, cooked 熟大螯虾	210
Shrimp, raw 生虾	70
Shrimp, cooked 熟虾	70
Crab, blanched 螃蟹	230
Crab, cooked 熟螃蟹	520

曲线标准值

下表是典型标准曲线参考值。结合比例以 400ppb 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。

甲壳动物含量/ppb	400ppb 的结合比率/%
400	100
200	64
60	22
20	9
0	3

性能

灵敏度

该试剂盒的检出限为 0.9ppb 的原肌球蛋白（印度对虾）。

常见基质检出限验证试验结果（ppb)如下：

Soy sauce 豆酱	1.7
Vegetable soup 蔬菜汤	3.6
Bakery products 面包制品	0.9
Fish 鱼	8.5
Meat 肉	10.3

该试剂盒的最低定量限为 20ppb 的原肌球蛋白。

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。

精度

批内稳定性	6-8%
批间稳定性	5-12%

回收率

不同样品中进行甲壳动物加标，测定平均回收率如下：

Soy sauce 豆酱	84%
Vegetable soup 蔬菜汤	93%
Bakery products 面包制品	90%
Fish 鱼	93%
Meat 肉	97%

线性

加标样品（大豆酱、蔬菜汤、面包制品、鱼和肉）系列浓度的结果在 74-114%。

交叉反应性

本试剂盒与以下产品无交叉反应。

Milk 牛奶	Fish 鱼	Macadamia nut 夏威夷果
Egg 鸡蛋	Oyster 牡蛎	Chestnut 栗
Wheat 小麦	Sunflower seeds 葵花籽	Pine nut 松子
Rye 黑麦	Pumpkin seeds 南瓜子	Soy 大豆
Oats 燕麦	Cashew 腰果	Lecithin (soy) 大豆磷脂
Barley 大麦	Peanut 花生	Pea 豌豆
Rice 大米	Hazelnut 榛子	Bean 黄豆
Corn 玉米	Almond 杏仁	Potato 土豆
Buckwheat 荞麦	Pecan 美洲山核桃	Carrot 胡萝卜
Sesame 芝麻	Coconut 椰子	Leek 韭葱
Pork meat 猪肉	Brazil nut 巴西坚果	Celery 芹菜
Beef 牛肉	Walnut 核桃	Mustard 芥末
Chicken meat 鸡肉	Pistachio 开心果	

其他交叉反应如下：

蟑螂（蛋白）	0.01%
--------	-------