

# 麸质过敏原

## 检测说明书

### 食品中麸质过敏原的定量酶免疫检测试剂盒

#### 试剂盒组分

试剂	1 板装 (1*8*12 孔)	
	数量	体积
包被麸质抗体的 96 孔板 (8*12 孔)	1	
阴性对照	1	1.5mL
标准品系列 (50、25、12.5、6.25、3.12ng/mL)	5	1.5mL
酶结合物	1	15mL
提取缓冲液	1	110mL
25 倍浓缩清洗液	1	65mL
5 倍浓缩稀释液	1	65mL
底物 (TMB)	1	15mL
终止液 (0.5M 硫酸)	1	15mL

另需购买乙醇和蒸馏水。

#### 检测原理

该产品基于双抗体夹心酶联免疫检测的原理。微孔板内包被单克隆 R5 抗体能直接捕获小麦醇溶蛋白、黑麦醇溶蛋白和大麦醇溶蛋白。因此，微孔捕获样品中的醇溶蛋白，经过清洗后，加入酶标记的第二抗体，与麸质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。麸质含量和显色浓度成正比。检测灵敏度可达 3ppm 麸质。

#### 注意事项

- 仔细阅读说明书。
- 检测开始前，使所有试剂回复至室温 (22-25℃)。
- 不同检测试剂盒中试剂不要混用。

4. 不要污染试剂盒。
5. 不要使用过期的试剂。不同批次的试剂盒不要混用。
6. 检测过程不要进食、饮水或抽烟，按照操作步骤的顺序和时间，中途不要停顿。
7. 不要用嘴吸取试剂。
8. 每个不同样本更换一次性吸头以免交叉污染。
9. 对照或标准品应和样品同时进行检测。
10. **注意。**底物由于对光照敏感，要妥善处理。使用时要避免光。
11. 终止液含有酸，要注意安全。

### **清洗步骤**

清洗步骤可以用自动清洗机，每次设置 300 微升。

孵育结束后，清洗按以下步骤进行：

1. 倒掉微孔中的液体。
2. 每孔加 300 微升清洗液。
3. 轻微摇晃，避免孔间污染。
4. 快速甩掉孔中液体。
5. 重复以上步骤不少于说明书描述的次数。
6. 不要让微孔干燥时间过长。
7. 最后一次清洗完，在吸水纸上拍干孔内残留液体。

### **试剂准备**

#### **清洗液**

按照 1 份浓缩清洗液加入 24 份蒸馏水的比例进行稀释。

#### **稀释液**

按照 1 份浓缩稀释液加入 4 份蒸馏水的比例进行稀释。

#### **酶结合物，对比样，标准品系列**

直接使用，不用稀释。每孔加 100 微升。

### **样品准备**

**注意：**巧克力样品和环境采样需要专用提取步骤，请联系厂商。

**热加工产品或含有大豆产品提取步骤：**

1. 在混匀有代表性的样品中称取 0.25g 磨碎的粉末样品放入塑料管中。

2. 加入 2.5mL 的提取液。
3. 盖上盖子并密封防止蒸发。
4. 涡旋混匀 5-10 秒。
5. 室温等待 20-60 分钟，期间涡旋 2-3 次。
6. 加入 7.5mL 的 80%乙醇，涡旋 10-60 秒充分混匀，室温搅拌 20-60 分钟（搅拌速度 45 转/分钟）。
7. 室温 2000-2500g 离心 10 分钟。
8. 取清液，待测。

#### **非热加工产品或不含大豆产品提取步骤：**

1. 在混匀有代表性的样品中称取 0.25g 磨碎的粉末样品放入塑料管中。
2. 加入 10mL 的 60%乙醇，室温搅拌 20-60 分钟。
3. 按照热加工样品处理步骤 7 以后进行。

**注意：**提取液可以在室温存放 7 天。存放时，密闭容器防止蒸发。

样品需要稀释后进行检测，稀释步骤如下：

1. 预估样品中麸质含量小于 10ppm:用样品稀释液稀释 12.5 倍
2. 预估样品中麸质含量 10-100ppm:用样品稀释液稀释 25 倍
3. 预估样品中麸质含量大于 100ppm:用样品稀释液稀释 50 倍

#### **稀释步骤：**

12.5 倍=920 $\mu$ L 稀释液+80 $\mu$ L 样品

25 倍=960 $\mu$ L 稀释液+40 $\mu$ L 样品

50 倍=980 $\mu$ L 稀释液+20 $\mu$ L 样品

一般来说，未知浓度样品建议稀释 25 倍。

#### **检测步骤**

1. 所有试剂回复到室温（大约 30 分钟）。
2. 取出适量微孔，分别加入 100 $\mu$ L 标准品和样品，封上孔板室温孵育 20 分钟。
3. 按照前述清洗步骤 3 次。

4. 吸取 100 $\mu$ L 酶结合物到每个微孔中，**室温孵育 20 分钟**。
5. 清洗微孔 3 次。
6. 吸取 100 $\mu$ L 底物到每个微孔中，**室温孵育 20 分钟**。
7. 吸取 100 $\mu$ L 终止液到每个微孔中，阳性孔将从蓝色变为黄色。
8. 混匀后在 450nm 波长下读取吸光值，不要放置超过 5 分钟。

### 结果表示

将吸光值输入表格计算出样品醇溶蛋白浓度，样品中麸质（谷蛋白）浓度为：

$\text{ppm 麸质} = C \cdot D \cdot 2 \cdot 40 / 1000$

C：样品中醇溶蛋白浓度 ng/mL

D：样品稀释倍数

40：样品制备过程稀释因子

1/1000：ng/mL 到 ppm 转换系数