

牛奶过敏原

检测说明书

食品中牛奶过敏原的定量酶免疫检测试剂盒

灵敏度（以牛奶计）	0.05ppm
回收率	79-122%
孵育时间	60 分钟

牛奶过敏原

牛奶是最重要的过敏原之一，尤其对于儿童而言。极微量牛奶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有含乳和乳制品的食物。在某些特定情况下，有些加工食品如香肠、曲奇饼干、方便食品和饮料中会存在潜在的牛奶过敏原。而根据欧盟相关法令，这些过敏原也要标示出来。食品中能够准确检出牛奶至关重要。牛奶蛋白中大约含 80% 的酪蛋白。乳清蛋白中的 β 乳球蛋白占了总蛋白的 10% 以上。

欧陆分析牛奶快检试剂盒是一种灵敏度高，专门性强的定量分析试剂盒，基于检测牛奶中蛋白（美国国家标准技术研究所参考物质 1549），广泛应用于曲奇饼干、面包屑、香肠、橙汁、酒、豆制品和巧克力等食品中牛奶，包括酪蛋白和 β 乳球蛋白等过敏原的检测。

检测原理

该产品基于酶联免疫检测的原理。微孔板内包被混合抗体能直接捕获牛奶蛋白。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，与牛奶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。牛奶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. 牛奶蛋白标准品 (0.04, 1.4 和 10ppm)：每瓶 2.0mL，共 5 瓶，红色，需要用样品稀释液稀释 100 倍后使用，如取 20 μ L 加 1980 μ L 稀释液。
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 5 倍浓缩液, 标记为红色, 和蒸馏水按 1+4 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 μ 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, 因为牛奶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。

固体样品请按以下步骤进行处理:

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. 0.5g 均匀样品中加入 10mL 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 μ L 清液 (肉制品和香肠样品需要再稀释 5 倍)。如果结果超出检测范围, 稀释后重测。

液体样品请按以下步骤进行处理:

取 0.5mL 均匀液体样品加 9.5mL 工作提取和样品稀释液，60C°水浴 15 分钟，期间每 2 分钟摇晃以确保提取均匀，然后按照上述固体样品提取步骤 4 进行。

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 XXXppm 的牛奶蛋白含量表示，可以乘以转换因子表示为以下形式：

脱脂奶粉（美国国家标准技术研究所参考物质 1549）	2.7
全脂奶粉（美国国家标准技术研究所参考物质 8435）	4.4
酪蛋白	1.0
β 乳球蛋白	1.1

曲线标准值

下表是典型标准曲线参考值。结合比例以 10ppm 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。

牛奶含量/ppb	10ppm 的结合比率/%
10	100
4	86
1	50
0.4	32
0	9

性能

灵敏度

该试剂盒的检出限为 0.05ppm 的牛奶蛋白。

常见基质检出限验证试验结果 (ppm)如下：

Soy milk 豆奶	0.13
Orange juice 橙汁	0.1
White wine 白酒	0.03
Bread crumbs 面包屑	0.08
Cookies 曲奇饼干	0.16
Chocolate 巧克力	0.1
Sausage 香肠	0.18

该试剂盒的最低定量限为 0.4ppm 的牛奶蛋白。

由于样品基质和空白的影响，检测结果低于最低定量限可视为阴性。

交叉反应性

本试剂盒与以下产品无交叉反应。

Almond 杏仁	Egg 蛋	Pork 猪肉
Barley 大麦	Hazelnut 榛子	Rice 大米
Beef 牛肉	Lupin 羽扇豆	Rye 黑麦
Celery 芹菜	Mustard 芥末	Sesame 芝麻
Chicken 鸡肉	Oats 燕麦	Soy 大豆
Cocoa 可可	Peanut 花生	Walnut 核桃
Cod 鳕鱼	Pistachio 开心果	Wheat 小麦
Corn 玉米		

其他交叉反应如下：

绵羊奶	0.94%
山羊奶	0.01%

精度

批内稳定性	8-10%
批间稳定性	10-17%

线性

加标样品（曲奇饼干、面包屑、巧克力、香肠、豆奶、橙汁和白酒）系列浓度的结果在 80-130%。

回收率

不同样品中进行牛奶加标，测定平均回收率如下：

曲奇饼干	102%
面包屑	110%
巧克力	99%
香肠	88%
豆奶	79%
橙汁	106%
白酒	122%