

# 鱼类过敏原

## 检测说明书

### 食品中鱼类过敏原的定量酶免疫检测试剂盒

灵敏度	1.4ppm
回收率	93-117%
孵育时间	60 分钟

#### 鱼类过敏原

鱼类属于最常见的过敏原。主要包含低分子量，钙化的肌肉蛋白-微白蛋白。这种蛋白的特点是高耐热性和稳定性，不易变性和酶解。在广大鱼类消费区域，如斯堪的纳维亚半岛、日本和地中海国家，鱼类过敏原是个严重影响健康的问题。过敏症包括皮肤发炎、肠胃病、呼吸困难甚至休克等生命危害。由于生物多样性，过敏患者会对不同种类鱼群表现为交叉反应的情况。食品中潜在的鱼类过敏原引起过敏人群产生严重问题。极微量鱼类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鱼类过敏原的食物。生产中的交叉污染也要特别防范。食品中的鱼类过敏原的检测是必不可少的，因此，准确检测成品中的鱼类过敏原是有必要的。

欧陆分析鱼类过敏原快检试剂盒是一种灵敏度高，专门性强的定量分析试剂盒，采用微白蛋白抗体可以检测不同鱼类共有的过敏蛋白，广泛应用于酒、汤料、香肠、咸饼干、鱼肉酱等制品中鱼类过敏原的检测。

## 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鱼类蛋白。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，与鱼类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。鱼类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. 鳕鱼蛋白标准品（0,4,10,40 和 100ppb）：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, 因为鱼类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 XXXppm 的鳕鱼含量表示，如果鱼的种类已知，可以乘以转换因子表示为以下形式：

以下表示按新鲜活鱼计算，实验表明，鳕鱼蒸煮 20 分钟后相当于活鱼的 25%。

Eel 鳗鱼	18	Sardine 沙丁鱼	14
Flounder 比目鱼	7.4	Haddock 黑线鳕	1.9
Perch 鲈鱼	1.1	Plaice 鲽鱼	3.5
Trout 鲑鱼	5.4	Swordfish 箭鱼	714
Pike 梭子鱼	1.2	Coalfish 黑鳕	3.2
Herring (smoked)烟熏鲱鱼	67	Devilfish 鳐鱼	91
Carp 鲤鱼	1.3	Sole 鲷目鱼	36
Salmon 大马哈鱼	39	Spined loach 泥鳅	16
Mackerel (smoked)烟熏鲭鱼	250	Turbot 多宝鱼	40
Red mullet 羊鱼	1.7	Tuna 金枪鱼	125
Shark catfish 鲨鱼	3.4	Catfish 鲶鱼	0.6
Redfish 红鲑鱼	36	Bass 鲈鱼	2.1
Samlet 萨门鱼	5.1	Zander 白梭吻鲈	3.3

曲线标准值

下表是典型标准曲线参考值。结合比例以 100ppm 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。

鱼类含量/ppm	100ppm 的结合比率/%
100	100
40	63
10	24
4	14
0	7

性能

灵敏度

该试剂盒的检出限为 1.4ppm 的鳕鱼。

常见基质检出限验证试验结果 (ppm)如下：

Wine (red) 红酒	1.5
Soup 汤	1.3
Worcester Sauce 伍斯特沙司	0.3
Asia Sauce 亚洲沙司	2.1
Cracker 饼干	0.5
Surimi 鱼肉酱	1.8
Spring Roll 春卷	1.3

该试剂盒的最低定量限为 4ppm 的鳕鱼。

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	7-12%
批间稳定性	4-10%

线性

加标样品（红酒、汤、伍斯特沙司、亚洲沙司、饼干、鱼肉酱和春卷）系列浓度的结果在 89-105%。

交叉反应性

本试剂盒与以下产品无交叉反应。

Almond 杏仁	Hazelnut 榛子	Pistachio 开心果
Barley 大麦	Isinglass 明胶	Pork 猪肉
Bean 黄豆	Lamb 羊肉	Potato 土豆
Beef 牛肉	Macadamia 夏威夷果	Pumpkin seed 南瓜子
Brazil nut 巴西坚果	Milk 牛奶	Rice 大米
Buckwheat 荞麦	Millet 小麦	Rye 黑麦
Carrot 胡萝卜	Mustard 芥末	Sesame 芝麻
Cashew 腰果	Oat 燕麦	Shrimp 虾
Celery 芹菜	Onion 洋葱	Soy 大豆
Chicken 鸡肉	Pea 豌豆	Sunflower seed 葵花籽
Corn 玉米	Peanut 花生	Walnut 核桃
Egg 蛋	Pecan 美洲山核桃	Wheat 小麦
Fish gelatin 鱼明胶		

回收率

不同样品中进行鱼类加标，测定平均回收率如下：

Wine (red) 红酒	103%
Soup 汤	117%
Worcester Sauce 伍斯特沙司	112%
Asia Sauce 亚洲沙司	103%
Cracker 饼干	99%
Surimi 鱼肉酱	114%
Spring Roll 春卷	93%