

# β乳球蛋白过敏原

## 检测说明书

### 食品中β乳球蛋白过敏原的定量酶免疫检测试剂盒

|              |         |
|--------------|---------|
| 灵敏度（以β乳球蛋白计） | 1.5ppb  |
| 回收率          | 70-107% |
| 孵育时间         | 60 分钟   |

#### β乳球蛋白过敏原

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 20% 的乳清蛋白。而乳清蛋白中大部分为热稳定的β乳球蛋白。

欧陆分析β乳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，广泛应用于曲奇饼干、粮食、香肠、橙汁、酒、豆制品和巧克力等食品中β乳球蛋白过敏原的检测。

#### 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β乳球蛋白。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 $\beta$ 乳球蛋白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。 $\beta$ 乳球蛋白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.  $\beta$ 乳球蛋白标准品 (0,10,40,100 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 4℃下可至少保存 1 周，冷冻后如有结晶要在 37℃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 $\beta$ 乳球蛋白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 100 $\mu$ L 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。

**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。

| β乳球蛋白含量/ppb | 400ppb 的结合比率/% |
|-------------|----------------|
| 400         | 100            |
| 100         | 61             |
| 40          | 36             |
| 10          | 15             |
| 0           | 5              |

**性能**

*灵敏度*

该试剂盒的检出限为 1.5ppb 的β乳球蛋白。

验证试验表明此检出限大致相当于 0.6ppm 未脱脂奶粉，或者 0.1ppm 脱脂奶粉（美国国家标准技术研究所参考物质 1549），和 0.5ppm 全脂奶粉（美国国家标准技术研究所参考物质 8435）。

该试剂盒的最低定量限为 10ppb 的β乳球蛋白。

验证试验表明此检出限大致相当于 3.7ppm 未脱脂奶粉，或者 0.6ppm 脱脂奶粉（美国国家标准技术研究所参考物质 1549），和 3.2ppm 全脂奶粉（美国国家标准技术研究所参考物质 8435）。

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。

|                    |                 |                     |
|--------------------|-----------------|---------------------|
| Egg 鸡蛋             | Cashew nut 腰果   | Lecithin 卵磷脂        |
| Wheat 小麦           | Peanut 花生       | Saccharose 蔗糖       |
| Oats 燕麦            | Hazelnut 榛子     | Cocoa 可可            |
| Rye 黑麦             | Walnut 核桃       | Orange 橘            |
| Barley 大麦          | Pecan nut 美洲山核桃 | Wine 酒              |
| Rice 大米            | Brazil nut 巴西坚果 | Peach 桃             |
| Corn 玉米            | Coconut 椰子      | Apricot 杏           |
| Buckwheat 荞麦       | Almond 杏仁       | Cherry 樱桃           |
| Soy 大豆             | Pistachio 开心果   | Plum 李              |
| Poppy seed 罂粟籽     | Macadamia 夏威夷果  | Beef 牛肉             |
| Sesame 芝麻          | Chestnut 栗      | Pork 猪肉             |
| Sunflower seed 葵花籽 | Chick pea 鹰嘴豆   | Chicken 鸡肉          |
| Pumpkin seed 南瓜子   | Pea 豌豆          | Bovine albumin 牛白蛋白 |
| Pine nut 松子        | Bean 黄豆         |                     |

其他交叉反应如下：

|     |         |
|-----|---------|
| 绵羊奶 | <0.2%   |
| 山羊奶 | <0.002% |
| 酪蛋白 | <0.2%   |

精度

|       |       |
|-------|-------|
| 批内稳定性 | 7%    |
| 批间稳定性 | 9-12% |

线性

加标样品（曲奇饼干、谷物、巧克力、香肠、豆奶、橙汁和白酒）系列浓度的结果在 72-127%。

回收率

不同样品中进行β乳球蛋白加标，测定平均回收率如下：

|      |      |
|------|------|
| 曲奇饼干 | 88%  |
| 谷物   | 94%  |
| 巧克力  | 86%  |
| 香肠   | 107% |
| 豆奶   | 70%  |
| 橙汁   | 98%  |
| 白酒   | 82%  |