

食品中乳铁蛋白的测定
酶联免疫吸附法

Detection of lactoferrin in foods —
enzyme-linked immunosorbent assay method

(草案)

××××-××-××发布

××××-××-××实施

中华人民共和国工业和信息化部 发布

前 言

本文件按照 GB/T 1.1-2020《标准化工作导则 第1部分：标准化文件的结构和起草规则》的规定起草。

本文件由全国食品工业标准化技术委员会提出。

本文件由全国食品工业标准化技术委员会归口。

本文件起草单位：

本文件主要起草人：

食品中乳铁蛋白的测定 酶联免疫吸附法

1 范围

本文件规定了食品中乳铁蛋白测定的酶联免疫吸附法。

本文件适用于生乳、巴氏杀菌乳、调制乳、风味发酵乳、含乳饮料等含乳或添加乳成分液体食品，以及调制乳粉、婴幼儿配方乳粉、固体饮料等含乳或添加乳成分固体食品中乳铁蛋白含量的测定。

2 规范性引用文件

下列文件中的内容通过文中的规范性引用而构成本文件必不可少的条款。其中，注日期的引用文件，仅该日期对应的版本适用于本文件；不注日期的引用文件，其最新版本（包括所有的修改单）适用于本文件。

GB/T 6682-2008 分析实验室用水规格和试验方法

3 原理

利用抗原-抗体特异性结合反应，对样品中乳铁蛋白含量进行竞争性酶联免疫吸附测定。

标准品或样品中游离的乳铁蛋白与其酶标记物竞争性的结合微孔中预先包被的乳铁蛋白抗体结合位点。未结合的乳铁蛋白在洗涤步骤被除去。结合的酶标记物将无色的底物转化为蓝色产物。加入反应终止液后颜色由蓝色转变为黄色。标准品或样品中乳铁蛋白含量与吸光度值成反比，通过测定 450 nm 波长下吸光度值和绘制标准曲线，计算得到样品中乳铁蛋白含量。

4 试剂和材料

4.1 乳铁蛋白酶联免疫吸附检测试剂盒（EuroProxima LACTOFERRIN FAST ELISA）¹参见附录 A，或与本标准检测原理相同且经等效验证的乳铁蛋白酶联免疫吸附检测试剂盒。

4.2 纯水

根据 GB/T 6682-2008《分析实验室用水规格和试验方法》规定的一级水。

4.3 空白婴幼儿配方乳粉

市售未添加且未标注含有乳铁蛋白的婴幼儿配方乳粉。

5 仪器和设备

¹ 给出这一信息是为了方便本文件的使用者，并不表示对该产品的认可。如果其他等效产品具有相同的效果，则可以使用这些等效的产品。

- 5.1 酶标仪：450 nm。
- 5.2 分析天平：感量 0.01 g。
- 5.3 涡旋混匀仪。
- 5.4 微孔板振荡器。
- 5.5 单道移液器：2 μL~20 μL，10 μL~100 μL，50 μL~200 μL，100 μL~1000 μL，500 μL~5000 μL。
- 5.6 八道移液器：30 μL~300 μL。

6 分析步骤

6.1 试剂配制

6.1.1 1×稀释缓冲液：按照 1:10 比例稀释试剂盒中 10×稀释缓冲液浓缩液，现配现用。如移取 1.0 mL 10×稀释缓冲液浓缩液到 9.0 mL 水中稀释混匀。

6.1.2 1×洗涤缓冲液：按照 1:20 比例稀释试剂盒中 20×洗涤缓冲液浓缩液，现配现用。如移取 1.0 mL 20×稀释缓冲液浓缩液到 19.0 mL 水中稀释混匀。1 个微孔需约 1.0 mL 1×洗涤缓冲液洗涤。

6.1.3 标准稀释工作液的配制：试剂盒标准品瓶中加入 2.0 mL 1×稀释缓冲液（6.1.1），混匀，得到浓度为 2.5 μg/mL 的标准稀释工作液。400 μL/管分装在洁净的 1.5 mL 离心管中，储藏在-20 °C 条件下至试剂盒有效期结束。每次测定前取出 1 管回复至室温，即为标准稀释工作液 7。

使用标准稀释工作液 7 进行其它梯度标准稀释工作液的配制：储藏在-20 °C 条件下的标准稀释工作液 7 回复至室温后，点甩离心，按照表 1 用 1×稀释缓冲液（6.1.1）逐级稀释并混匀。

表 1 梯度标准稀释工作液的配制

编号	浓度 (μg/mL)	配制方法
标准稀释工作液 1	0	200 μL 1×稀释缓冲液
标准稀释工作液 2	0.078	200 μL 标准稀释工作液 3 + 200 μL 1×稀释缓冲液
标准稀释工作液 3	0.156	200 μL 标准稀释工作液 4 + 200 μL 1×稀释缓冲液
标准稀释工作液 4	0.313	200 μL 标准稀释工作液 5 + 200 μL 1×稀释缓冲液
标准稀释工作液 5	0.625	200 μL 标准稀释工作液 6 + 200 μL 1×稀释缓冲液
标准稀释工作液 6	1.250	200 μL 标准稀释工作液 7 + 200 μL 1×稀释缓冲液
标准稀释工作液 7	2.500	标准品瓶中加入 2.0 mL 1×稀释缓冲液

6.1.4 1×酶标记物：使用前点甩离心。用 1×稀释缓冲液（6.1.1）按照 1:100 比例稀释试剂盒中 100×乳铁蛋白-HRP 浓缩液，现配现用。样品数为 X 个，需配制 1×酶标记物的体积为 (7+X)×2×50 μL+50 μL。如样品数为 1 个，需配制 850 μL 1×酶标记物，移取 8.5 μL 100×乳铁蛋白-HRP 浓缩液到 841.5 μL 1×稀释缓冲液（6.1.1）中稀释混匀。

6.1.5 试剂配制前将试剂盒回复至室温，使用完尽快放置 2 °C~8 °C。

6.2 样品前处理

6.2.1 乳铁蛋白含量/标签值<200 mg/kg (L) 的样品

6.2.1.1 液体样品

计算稀释倍数，使得测定前样品中乳铁蛋白的浓度在 0.156~0.313 $\mu\text{g/mL}$ 之间，如稀释倍数为 100 倍，需进行二级稀释：移取 100 μL 液体样品，加入 900 μL 1 \times 稀释缓冲液（6.1.1），涡旋混匀 30 s 得到一级稀释液；移取 100 μL 一级稀释液到 900 μL 1 \times 稀释缓冲液（6.1.1）中，漩涡混匀 30 s 后得到二级稀释液。

6.2.1.2 固体样品

计算稀释倍数，使得测定前样品中乳铁蛋白的浓度在 0.156~0.313 $\mu\text{g/mL}$ 之间，如稀释倍数为 200 倍，需进行溶解和稀释：取 1.00 g 样品，加水至 10 mL，涡旋混匀 5 min 后，移取 50 μL 液体样品，加入 950 μL 1 \times 稀释缓冲液（6.1.1），涡旋混匀 30 s 得到稀释液。

6.2.2 乳铁蛋白含量/标签值在 200~2500 mg/kg (L) 范围内的样品

计算稀释倍数，使得测定前样品中乳铁蛋白的浓度在 0.156~0.313 $\mu\text{g/mL}$ 之间，如稀释倍数为 2000 倍：固体样品称取 1.00 g，液体样品移取 1.0 mL，加水至 10 mL，涡旋混匀 5 min 后，移取 50 μL 混匀后的样品溶液至 450 μL 1 \times 稀释缓冲液（6.1.1）中稀释混匀得到一级稀释液；移取 50 μL 一级稀释液到 950 μL 1 \times 稀释缓冲液（6.1.1）中，涡旋混匀 30 s 后得到二级稀释液。

6.2.3 乳铁蛋白含量/标签值 ≥ 2500 mg/kg (L) 的样品

计算稀释倍数，使得测定前样品中乳铁蛋白的浓度在 0.156~0.313 $\mu\text{g/mL}$ 之间，如稀释倍数为 40000 倍：先按照 6.2.2 进行样品前处理，称取 1.00 g 样品，加水至 10 mL，涡旋混匀 5 min，用 1 \times 稀释缓冲液（6.1.1）稀释 400 倍后，得到样品二级稀释液。

对空白婴幼儿配方乳粉（4.3）进行样品前处理：称取 1.00 g 样品，加水至 10 mL，涡旋混匀 5 min，用 1 \times 稀释缓冲液（6.1.1）稀释 200 倍后，得到空白婴幼儿配方乳粉稀释液。

用空白婴幼儿配方乳粉稀释液对样品二级稀释液进行进一步稀释，移取 50 μL 样品二级稀释液到 450 μL 空白婴幼儿配方乳粉稀释液中混匀，此为用于测定的样品液。

6.3 测定

将预先包被有乳铁蛋白抗体的微孔插入微孔板架并做好标记，标准稀释工作液和样品均做双平行。

平行加入 50 μL 标准稀释工作液 1~7 和样品至微孔，再加入 50 μL 1 \times 酶标记物（6.1.4）至每个微孔。轻轻地水平摇动微孔板使其均匀混合，20 $^{\circ}\text{C}$ ~25 $^{\circ}\text{C}$ 黑暗处避光孵育 30 min。孵育结束后，倒去微孔中的液体，每个微孔每次加入 300 μL 1 \times 洗涤缓冲液（6.1.2）洗涤并在吸水纸上拍干，洗板 3 次。洗板结束后，加入 100 μL 底物/发色剂至每个微孔，20 $^{\circ}\text{C}$ ~25 $^{\circ}\text{C}$ 黑暗处避光孵育 15 min。孵育结束后，加入 100 μL 终止液至每个微孔，并立即读取 450 nm 波长下吸光度值。

7 结果与计算

7.1 标准曲线制作和测定结果计算

以标准稀释工作液 2~7 质量浓度为横坐标，式（1）计算的百分比为纵坐标，绘制半对数曲线，计算样品液中乳铁蛋白浓度。

乳铁蛋白标准稀释工作液和样品液的百分比吸光度值按式（1）计算：

$$A = \frac{S}{S_0} \times 100\% \dots\dots\dots (1)$$

式中：

A —— 百分比吸光度值；

S —— 乳铁蛋白标准工作稀释液或样品液的平均吸光度值；

S_0 —— 标准稀释工作液 1 的平均吸光度值。

可以使用试剂盒配套分析软件 RIDASOFT® Win 中 cubic spline 模式进行标准曲线绘制和测定结果计算，得到待测样品液中的乳铁蛋白的浓度。

7.2 测定结果表述

固体样品中乳铁蛋白含量按式（2）计算：

$$X = \frac{c \times f \times V}{m} \times \frac{1000}{1000} \dots\dots\dots (2)$$

式中：

X —— 样品中乳铁蛋白含量，单位为毫克每千克（mg/kg）；

c —— 待测样品液中乳铁蛋白浓度，单位为微克每毫升（ $\mu\text{g/mL}$ ）；

f —— 样品稀释倍数，除第一步固体样品溶解之外的稀释倍数；

V —— 定容体积，为 10 mL；

$\frac{1000}{1000}$ —— 从 $\mu\text{g/mL}$ 更换为 mg/kg 的换算；

m —— 样品质量，单位为 g；

液体样品中乳铁蛋白含量按式（3）计算：

$$X = c \times f \times \frac{1000}{1000} \dots\dots\dots (3)$$

式中：

X —— 样品中乳铁蛋白含量，单位为毫克每升（mg/L）；

c —— 待测样品液中乳铁蛋白浓度，单位为微克每毫升（ $\mu\text{g/mL}$ ）；

f —— 样品稀释倍数；

$\frac{1000}{1000}$ —— 从 $\mu\text{g/mL}$ 更换为 mg/L 的换算；

注：结果保留小数点后两位有效数字。

8 质量控制

8.1 试剂失效

出现以下情况之一表明试剂失效，不能进行测定或测定结果作废：

- 贮存在试剂瓶中的底物颜色出现蓝色；
- 加入终止液后标准稀释工作液 1 (0 $\mu\text{g/mL}$) 吸光度值 <0.8 。

8.2 精密度

在重复性条件下获得的两次独立测定结果的绝对差值不得超过算术平均值的 15%。

9 检测限和定量限

本方法检测生乳的检测限为 46.50 mg/L，定量限为 64.52 mg/L；巴氏杀菌乳的检测限为 7.02 mg/L，定量限为 9.25 mg/L；调制乳的检测限为 6.19 mg/L，定量限为 8.33 mg/L；风味发酵乳的检测限为 7.00 mg/L，定量限为 9.80 mg/L；含乳饮料的检测限为 7.12 mg/L，定量限为 8.91 mg/L；调制乳粉的检测限为 13.22 mg/kg，定量限为 17.08 mg/kg；婴幼儿配方乳粉的检测限为 11.40 mg/kg，定量限为 13.77 mg/kg；固体饮料的检测限是 13.58 mg/kg，定量限为 17.04 mg/kg。

附录 A

(规范性)

乳铁蛋白酶联免疫吸附检测试剂盒

A.1 试剂盒组成

乳铁蛋白检测试剂盒 EuroProxima LACTOFERRIN FAST ELISA包括：

- a) 预包被乳铁蛋白抗体的 96 孔可拆分微孔板：12×8 孔；
- b) 100×乳铁蛋白-辣根过氧化物酶浓缩液：150 μL/瓶×1 瓶；
- c) 乳铁蛋白标准品冻干粉：3 瓶；
- d) 10×稀释缓冲液浓缩液（磷酸钠、磷酸二氢钠、氯化钠、吐温 20、明胶）：30 mL/瓶×1 瓶；
- e) 20×洗涤缓冲液浓缩液（磷酸钠、磷酸二氢钠、氯化钾、氯化钠、吐温 20）：30 mL/瓶×1 瓶；
- f) 底物/发色剂（3,3',5,5'—四甲基联苯胺）：12 mL/瓶×1 瓶；
- g) 终止液（0.5 mol/L 硫酸）：15 mL/瓶×1 瓶。

A.2 试剂盒验收和保存

- A.2.1 每个批号试剂盒应进行回收率测试的验收试验，回收率符合质量控制要求。
- A.2.2 试剂盒于 2℃~8℃ 黑暗处避光保存，使用前回复至室温。
- A.2.3 不同批号试剂盒中组分不得混用。
- A.2.3 超过有效期的试剂盒不得使用。

A.3 标准曲线谱图

标准曲线谱图示例见图A.1。

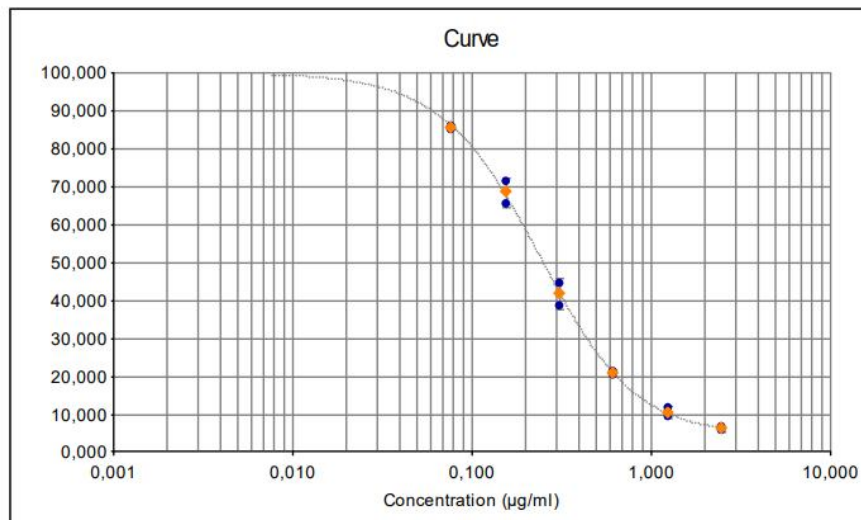


图 A.1 标准曲线谱图示例