

r-biopharm®



RIDASCREEN® Peanut

酶联免疫法定量检测花生暨花生蛋白

订货号: R6811



体外检测试剂

储存温度 2 - 8 °C

拜发分析系统销售（北京）有限公司

电话: +86 10 8458 3218 传真: +86 10 8458 0691

地址:

拜发分析系统销售（北京）有限公司
北京市朝阳区阜通东大街 6 号方恒国际中心 A 座 1903
邮编: 100102
www.r-biopharm.com

欢迎随时联系德国拜发中国区:

电话:

客服中心: +86 10 8458 3218

传真/邮箱:

销售部: +86 10 - 84 58 32 18 - 223
info@r-biopharm.cn

市场部: +86 10 - 84 58 32 18 - 217
info@r-biopharm.cn

RIDA® 和 RIDASCREEN®

均为 R-Biopharm 德国拜发公司的注册品牌标志
制造商: R-Biopharm AG, Darmstadt, 德国

R-Biopharm AG 拥有 ISO 9001 认证。

RIDA® and RIDASCREEN®

are registered trademarks of R-Biopharm AG
Manufacturer: R-Biopharm AG, Darmstadt, Germany

R-Biopharm AG is ISO 9001 certified.

产品简介

RIDASCREEN® Peanut (订货号: **R6811**) 花生检测试剂盒, 采用夹心酶联免疫法, 用于定量检测食品 (参见 1. 用途中列出的已验证样品基质) 中的花生暨花生蛋白。试剂盒中含有酶联免疫检测所需的所有试剂, 包括标准品。试剂盒足够进行 **96** 次检测 (包括标准测定)。定量分析需要使用微孔板酶标仪。

RIDASCREEN® Peanut 花生检测试剂盒已获得 **AOAC-RI** 认证 (PTM 编号: **112102**)。

样品处理:	均质、提取和离心
检测时间:	样品制备 (以 10 个样品为例) 约 20 分钟 检测过程 (孵育时间) 50 分钟
标准物质:	NIST 有证参考物质 2387 (花生酱) (蛋白含量: 22.2 ± 0.5 g / 100 g)
检测限: (基质相关)	0.15 mg/kg 花生 * (相当于 0.033 mg/kg 花生蛋白) 具体验证数据请参见德国拜发集团的验证报告
定量限:	0.75 mg/kg 花生 (相当于 0.166 mg/kg 花生蛋白)
特异性:	本试剂盒中所使用的抗体可以特异性识别花生蛋白。与 91 种已经测试的食品种类均无交叉反应。

可查询试剂盒验证报告获取详情。

试剂盒中所使用的抗体的交叉反应, 是针对纯食品 (例如玉米粉) 本身进行的检测。而针对加工的配方食品 (如玉米面包), 此处给出的交叉反应可能会有所不同。潜在的干扰物质 (如多酚) 会在进行样品的添加回收试验过程中通过结果分析出来 (参见 13. 方法局限性)。

为了提升进行 **ELISA** 检测时的效果, 德国拜发集团建议您参考 **GEP** (**ELISA** 良好操作规程) 手册, 手册中为您详细介绍了如何正确使用和进行 **ELISA** 操作, 及在操作过程中需要注意的关键点等。**GEP** 手册可以登录 www.r-biopharm.com/products/food-feed-analysis 网站进行阅读或下载。

相关产品

- bioavid Lateral Flow Erdnuss/Peanut 花生快速检测条 (BL606-10 / BL606-25)
- bioavid Lateral Flow Erdnuss/Peanut inkl. HOOK Line 带钩状效应指示带的花生快速检测条 (BLH706-20)
- SureFood® ALLERGEN Peanut 花生实时荧光 PCR 检测试剂盒(S3603)
- SureFood® ALLERGEN 4 Plex Peanut/Hazelnut/Walnut + IAC 花生/榛子/胡桃 + 抑制质控实时荧光 PCR 四联检试剂盒 (S3402)

1. 用途

RIDASCREEN® Peanut（订货号：R6811）花生检测试剂盒，采用夹心酶联免疫法，用于定量检测食品中的花生暨花生蛋白。考虑到食品样品的多样性，下列不同种类的食品样品已经使用本试剂盒进行检测验证：包括膨化米饼、麦片棒、饼干、冰淇淋、学生零食和牛奶巧克力等。当然，本试剂盒在经过使用者自行验证确认后，也可以用于其他种类样品。

具体的验证数据、结果及验证的食品基质等信息，欢迎查阅德国拜发集团提供的试剂盒验证报告。

2. 概要

花生 (*Arachis hypogaea*) 虽然在植物学上属于豆科和草本植物，而不是坚果，但它的味道和通常的消费量与树坚果相似。可以说，花生是全世界最受欢迎的“坚果”之一。花生是巧克力产品中的常见成分，也常出现在零食和饼干等烘焙食品中。

花生的蛋白质含量很高，高达 25% 左右。花生中许多蛋白质都是已知具有过敏性的，如花生球蛋白和伴花生球蛋白，其含量占比都相对较高。花生也是八大类食物过敏原之一。对花生的过敏是最严重的过敏反应之一，可直接导致致命的过敏性休克。摄入可能不到一毫克的花生，就有可能引起过敏人群的非常严重的过敏反应。因此，在美国、欧盟以及许多其他国家，都是强制性要求含有花生的食品的标签上进行明确标注的。对过敏人群而言，最主要危险是本以为是不含花生的食物中所出现的花生的污染（例如巧克力中含有的微量花生）。因此，针对有可能在生产过程中被非有意加入的花生污染的食品，检测其中的花生含量是非常重要的。

在 2019 年，Taylor 等人 (2019 VITAL Scientific Expert Panel Recommendations, The Allergen Bureau Limited (<http://allergenbureau.net/>)) 重新评估了花生的 VITAL 值。该研究发现，ED01 值 – 即 99% 的过敏患者在该花生浓度水平上不会发生过敏反应，为食用分量中的 0.2 mg 花生蛋白。ED05 值 – 即 95% 的过敏患者在该花生浓度水平上不会发生过敏反应，为食用分量中的 2.1 mg 花生蛋白。

3. 检测原理

检测的基础是抗原抗体反应。微孔板中包被有针对花生蛋白的特殊抗体。加入标准品或样品，其中含有的花生蛋白和特殊的抗体结合形成抗体抗原复合物。没有结合的部分在洗涤步骤中被除去。随后加入过氧化物酶标记的抗体（酶连接物）。抗体酶连接物和抗体抗原复合物结合，形成抗体-抗原-抗体复合物（“三明治”夹心法）。没有结合的酶连接物在洗涤步骤中被除去。将底物/发色剂加入孔中。和抗体结合的酶将发色剂转化为蓝色的产物。加入反应终止液后使颜色由蓝色转变为黄色。在 450 nm 处测量。吸光度值与样品中的花生浓度成正比。检测结果显示为 mg/kg（ppm）花生或花生蛋白。

4. 试剂盒组份

每一个盒中的试剂足够进行 96 个试验（包括标准测定）。

试剂盒中的组份	瓶盖颜色	试剂状态		含量
Microtiter plate 微孔板	-	即开即用型	-	96 孔
Allergen extraction buffer 过敏原提取缓冲液	绿色	浓缩液	10x	100 ml
Standard 1* 标准品 1	透明	即开即用型	0 mg/kg	1.3 ml
Standard 2* 标准品 2	透明	即开即用型	0.75 mg/kg	1.3 ml
Standard 3* 标准品 3	透明	即开即用型	1.5 mg/kg	1.3 ml
Standard 4* 标准品 4	透明	即开即用型	3.0 mg/kg	1.3 ml
Standard 5* 标准品 5	透明	即开即用型	6.0 mg/kg	1.3 ml
Wash buffer 洗涤缓冲液	棕色	浓缩液	10x	100 ml
Conjugate 酶标记物	红色	即开即用型		11 ml
Substrate/Chromogen 底物/发色剂	棕色	即开即用型		13 ml
Stop Solution 终止液	黄色	即开即用型		14 ml

*) 已考虑了在样品处理的过程中产生的稀释倍数 20。所以样品中花生浓度可直接从标准曲线中读出。

5. 另需的试剂和设备

5.1. 设备:

– 实验室手套

- 天平（量程至少为 50 g，精度为 ± 0.01 g）
- 粉碎机，研钵，Ultra-Turrax 匀浆机或者均质器
- 离心机（至少 2500 g）+ 带盖离心管（例如 Greiner 的 50 毫升离心管，订货号：227261）
- 振荡器
- 水浴锅（60°C；请关注水浴锅厂家提供的温度偏差范围）
- 槽型滤纸（孔径 8 - 12 μm ）
- 刻度移液管
- 刻度量筒
- 可调式 20 μl - 200 μl 和 200 - 1000 μl 微量移液器
- 选配：空白 96 孔板（例如 Thermo Fisher Scientific 订货号 95029390，或 Greiner bio-one 订货号 655901）
- 选配：8 道排枪（100 μl ）
- 微孔板酶标仪（450 nm）
- 建议：RIDASOFT® Win.NET 数据分析软件（订货号：Z9996FF）

5.2. 试剂：

- 蒸馏水或去离子水
- 脱脂奶粉（食品级，无花生）

6. 操作者应该注意之事项

建议由经过相关培训的实验人员进行本试剂盒的使用操作。请严格按照说明书的要求使用本试剂盒。

试剂盒中可能含有对健康有害的物质。请在德国拜发集团官方网站 www.r-biopharm.com 上获取 MSDS，了解关于本试剂盒内所含化学品的安全信息。

板孔（试剂盒中提供的预包被微孔板，及 10.2 中提到的额外的预混板）均不可二次使用。每个标准品和样品取液时均需要换新枪头，以避免交叉污染。请在移取不同的标准品及样品时，均换用新的干净的移液头，避免交叉污染。

所有试剂和材料在使用后必须按照保护人类和环境的要求进行回收或独立处置。请遵守相应的国家法规（如《循环管理法》、《危险物质条例》等）。

7. 储存条件

保存试剂盒于 2 - 8 °C，不要冷冻。

请先让封装在铝箔袋中的微孔板，整体回温至室温（20 - 25 °C）。然后再打开铝箔袋，取出其内的微孔板。这样可以避免因为急剧温差而导致微孔板孔产生水汽凝结液滴。

将不用的微孔板放进原铝箔袋中并且与提供的干燥剂一起重新密封储存于 2 - 8°C 条件下。

红色的底物/发色剂对光敏感，因此要避免直接暴露在光线下。

对过了有效期（见试剂盒外标签有效期）的试剂盒不再提供任何质量保证。

不能交叉使用不同批号的盒中试剂。

8. 试剂变质的迹象

- 红色底物/发色剂在使用前颜色变蓝
- 标准品 5 的吸光度值小于 1.2 ($A_{450\text{ nm}} < 1.2$)

9. 样品处理

在检测及样品处理的全操作过程中均须戴好实验室手套。空气中粉尘级别的过敏原及不干净的实验室器具均有可能导致检测污染。因此建议采取以下措施：

- 在处理完每个样品后均对耗材及操作台表面、玻璃器皿、均质器及其解除了的其他耗材进行彻底清洁。
- 样品处理和 ELISA 检测必须分在两个不同的实验室内进行

使用之前将所有试剂回温至室温（20 - 25 °C）。

过敏原提取缓冲液为 10 倍浓缩液。在稀释前在水浴锅中 37 °C 条件下充分溶解可能出现的结晶并混合。然后对加热后的浓缩液按比例 1:10（1+9）用蒸馏水稀释（例如：100 ml 缓冲液浓缩液 + 900 ml 蒸馏水）。**稀释后的提取缓冲液 AEP** 可在 20 - 25°C 条件下保存约 4 周或在 2 - 8 °C 条件下可保存约 12 周。

请确认，已经及时地将稀释后的过敏原提取缓冲液（AEP）在 60 °C 水浴中预热。

在下文中常用到的缩写及其含义：

- **AEP**：稀释配制好后的过敏原提取缓冲液

9.1. 使用 AEP 及脱脂奶粉进行样品提取

请先将 **AEP** 在样品提取前预热至 60 °C。

- 对具有代表性的足够量样品进行均质（彻底粉碎、碾磨、混匀）处理
- 取 1 g（若为液体样品则取 1 mL）均质后的样品至于干净的试管中，加入 1 g 脱脂奶粉

- 再加入 20 mL（若为液体样品，则应是加入 19 mL）预热的（参见 9.）过敏原提取缓冲液 AEP
- 涡旋振荡，充分混合
- 在 60 °C 水浴条件下提取 10 分钟，偶尔振荡
- 样品管置于冰浴中冷却 3 - 5 分钟
- 过滤或离心：10 min / 至少 2500 g / 尽量保持 4 °C
（或将 2 ml 提取液收集于一反应容器中，在微量离心机中 > 10000 g 高速离心 10 分钟）
- 将过滤或离心后的清液，移至一个干净的试管中。
- 若在离心后仍然无法得到无颗粒的澄清上清液，则可再进行过滤
- 离心或过滤后得到的上清液可在当天内室温(20 - 25 °C)保存并须在当天检测。若将其置于密封管中则可在 2 - 8°C 条件下保存 2 天。不需使用的上清液，可在 -20°C 条件冷冻保存一个月左右。

备注

实际操作中，可以选择对脱脂奶粉进行称量后加入样品，也可以选择将称量好的脱脂奶粉先加入 AEP 中进行预混（每 20 ml AEP 中加入 1 g 脱脂奶粉）。混合了脱脂奶粉的 AEP 只有当天有效。

若样品的检测结果超出了标准曲线的浓度范围，则须用混合了脱脂奶粉的 AEP 溶液（每 20 ml AEP 中加入 1 g 脱脂奶粉）对样品进行进一步的稀释。

10. 检测步骤

10.1. 检测前的准备

使用之前将所有试剂回温至室温（20 - 25 °C）。

洗涤缓冲液为 10 倍浓缩液，在稀释前如果存在结晶，应在 37 °C 水浴锅中加热完全溶解并混合。然后对加热后的浓缩液按比例 1:10（1+9）用蒸馏水稀释（例如：100 ml 缓冲液浓缩液 + 900 ml 蒸馏水）。稀释后的缓冲液在 20- 25 °C 条件下可保存约 4 周。

其他不使用的试剂请立刻放回冰箱 2 - 8°C 保存。

10.2. 检测操作

仔细洗板非常重要。避免在操作过程中微孔出现干燥。

每次检测不应使用多于 3 条微孔板条（24 孔）。若必须使用多于三条微孔板条，建议另外取用一块空白的干净的微孔板（参见 5.1）作为预混板使用，以去除因为单孔加样而带来的孔与孔之间的反应时间差。即将所有的标准品和样品都先加入到预

混板中（至少 150 µl 每孔），然后使用八道移液器将预混板孔中的液体快速地准确移加 100 µl 到试剂盒的反应板孔中。

建议酶标记物、底物/发色剂和终止液的加取均使用多道移液器或分液器，以减少加液上板的孔间时间差。

1. 将足够标准品和样品检测所需数量的孔条插入微孔板架，记录下标准品和样品的位置。建议均进行双平行检测。
2. 将 100 µl 标准品及按照 9. 处理好的样品溶液加到相应的微孔中，在室温条件下（20 - 25 °C）孵育 20 分钟。
3. 倒出孔中的液体，将微孔板架倒置在吸水纸上拍打（每轮拍打 3 次）以保证完全除去孔中的液体。每孔加入 250 µl 稀释后的洗涤缓冲液（参见 10.1.）洗涤微孔。上述操作重复进行三遍（总共洗板 4 遍！）。
4. 向每一个微孔中加入 100 µl 酶连接物溶液，在室温条件下（20 - 25 °C）继续孵育 20 分钟。
5. 倒出孔中的液体，将微孔板架倒置在吸水纸上拍打（每轮拍打 3 次）以保证完全除去孔中的液体。每孔加入 250 µl 稀释后的洗涤缓冲液（参见 10.1.）洗涤微孔。上述操作重复进行三遍（总共洗板 4 遍！）。
6. 向每一个微孔中加入 100 µl 红色底物/发色剂，充分混合后在室温（20 - 25 °C）条件下暗处孵育 10 分钟。
7. 向每一个微孔中加入 100 µl 反应终止液，充分混合。在加入反应终止液后 30 分钟¹内于 450 nm 处测量吸光度值。

¹ 实际数据显示，在加入终止液后 30 分钟内读数，结果均为稳定可靠的。但 AOAC 认证中使用的是 10 分钟内读数。

11. 结果评估

请使用 R-Biopharm 德国拜发公司专门为 RIDASCREEN® 系列产品设计的应用软件 RIDA® SOFT Win（订货号：Z9996FF）来进行结果分析。使用 4 参数曲线功能进行结果评估。

进行样品的结果评估前，请确认该次检测的数据结果尤其是标准曲线，是符合基本评估要求的。关于标准曲线请参看试剂盒中附带的质保证书。

本试剂盒也可以使用单孔检测。良好的单孔检测操作，不会影响试剂盒的性能。但若使用单孔检测，请在 RIDASOFT® Win 软件中正确选择单点检测设置。不建议将单孔检测的方法设立为常规检测方法。建议实验室按照自身情况，对若使用单孔检测时可能存在的风险进行风险管理分析。友情提示，单孔检测的方法不符合 EN 15633-1 和 EN 15842 标准的要求，也与 AOAC 认证的方法不符。在单孔检测的情况下，检测过程中出现错误（例如移液错误）但被忽视的可能性是会大大增加的。此外，单孔检测也可能会引致检测结果出现更大的偏差。

12. 结果分析

RIDASCREEN®FAST Peanut 2021-12-

检测结果以 mg 花生/kg 食品样品的形式报告。若需要显示为每 kg 食品中所含的花生蛋白含量，则需要依据所使用的花生标准物质中蛋白质的含量百分比，进行系数换算，用本检测结果乘以换算系数，即根据本试剂盒定标的 NIST 参考物质所取用的 0.222。

在 LOD 和 LOQ 浓度范围之间的检测结果，指示所检测的样品中含有少量的目标检测物（花生）。在这个范围区间内的浓度，是普遍存在比较大的变异性和不确定性的，请周知。建议不将落在此范围区间内的浓度值直接采纳为定量检测结果值进行报告，而是报告为 < LOQ 的形式。

低于 LOD 浓度范围的检测结果，并不能完全排除样品中没有低于 LOD 浓度的花生过敏原污染的可能性，包括其他花生成份例如脂。在出具检测结果报告时请给予相应的考量和正确的表述。

检测结果若超出了试剂盒标准 5 的浓度，则需要将样品进行进一步的稀释后再重新检测。同时在重新检测时，必须在结果分析是将所采用的的进一步稀释倍数考虑计算进去。进一步稀释应该使用混合了脱脂奶粉的 AEP 溶液（每 20 ml AEP 中加入 1 g 脱脂奶粉）。

若所得到的标准曲线的 OD 吸光度值显著高于试剂盒中质保证证书给出的标准曲线的 OD 吸光度值，尤其是当零标准品出现这个情况的时候，很可能该次检测的洗板不充分或者检测过程中被花生污染。

13. 方法局限性

样品的基质、检测操作过程和检测实验室环境，都可能直接影响检测结果。

检测限和定量限直接与不同的样品基质、样品的被加工程度及样品提取效果相关。

不同花生品种里的蛋白含量可能存在差异。由于试剂盒标准品中使用的花生为选取的有代表性的花生参考物质，不同的花生品种可能导致检测结果出现不同。

检测结果超出试剂盒曲线范围，则无法保证其仍具有良好的回收率等技术性能。因此，尤其是那些正好位于本方法技术性能限制节点浓度（如位于检测限浓度、定量限浓度、检测范围上限浓度点）的样品，可能出现节点周围（或检查范围内、或检测范围外）的波动。因此，在测定回收率时，请规避检测曲线范围的起始点（LOD, LOQ）和终点（最大标准曲线浓度点）这样的绝对值浓度，而是选取在曲线范围中部区间的浓度。

样品称量的偏差可以直接导致检测结果的偏差（例如，称量时多了 10%，则检测结果浓度也会高出 10%）。若要得到可靠并有效的检测结果，则样品称量的偏差应该不得超过 $\pm 1\%$ 。

请联系德国拜发获取本试剂盒产品的详细验证报告，了解其他食品样品的检测性能情况。德国拜发的产品验证报告中，包含有国际联合实验室间验证及国际环形实验的数据。

本试剂盒的验证选取的是部分有代表性的样品基质。若需要检测未经德国拜发验证的样品基质，则建议用人工加标实验的方法进行该基质的性能验证。同时建议对有需要的样品基质进行验证。

食品的基质多种多样，因此无法完全保证检测彻底不受样品基质的干扰。样品基质干扰可能导致假阳性或偏高的检测结果，也可能因为存在抑制效应而导致偏低的检测结果。样品基质干扰与本试剂盒所使用的抗体的特异性无关，可通过人工加标实验的方法进行证实。

在加工（加热、烘干）食品的过程中，蛋白质可能会出现变性等变化，以及/或者变成片段，从而导致针对此类样品基质的交叉反应结果出现改变。

交叉反应是指抗体在捕获目标抗原的同时，附带地也将与目标抗原类似的位点捕获而产生的一种附带反应。尤其是抗原的类似物种容易发生交叉反应。与基质干扰不同，交叉反应是抗原抗体间的一种特殊反应。在外环境影响（如加热、干燥）下，某些类似抗原物会出现结构上的改变从而令其结果上与目标检测抗原非常接近。因此，在食品加工过程后，会出现交叉反应增强或者减弱的情况。

在测定交叉反应时，所选用的是具有代表性的样品，但不排除其他样品可能带来结果的偏差。德国拜发集团提供的试剂盒国际验证报告中，已明确列出了试剂盒性能测试中使用的样品和基质。

14. 建议

为了获得更好的检测效果，我们建议：

- 按照 EN 15633-1 和 15842 标准的要求来进行检测，例如每个样品均进行双平行检测。
- 在取液加样前，使用对应的标准品或样品液预润移液器枪头。
- 检测样品的同时进行质控样品的检测，以确定检测的效果和正确性。使用不含花生蛋白的阴性样品和人工添加花生蛋白的阳性样品作为质控样品进行检测。德国拜发的验证报告中给出了进行样品人工添加的示例。
- 针对强酸性或强碱性样品，需要在检测前先将其 pH 值调整至中性（6.5 至 7.5 间）。
- 可使用 SureFood® 系列 PCR 检测试剂盒来进行结果验证
- 若需要配合全自动工作站例如 Thunder Bolt® / Bolt 进行全自动检测操作，请联系德国拜发 R-Biopharm 集团 info@r-biopharm.de 了解详情

欢迎联系德国拜发 R-Biopharm 集团了解更多产品和检测方法的相关信息！

图标解释

- 通用图标:

 参照产品说明书


 批号


 保质期 (年-月)

 贮存温度

 订货号

 检测样品量

 生产日期 (年-月)

 生产商 + 地址

声明

用户承担使用产品和服务的全部风险。R-Biopharm AG 将保证其产品和服务符合 R-Biopharm AG 设定的所有质量控制标准，并且 R-Biopharm AG 可以选择更换或维修在以下方面存在缺陷的任何组件，产品或重复服务：产品特定保修期内或有效期之内的工艺或材料，并且经核查应披露其本身具有的缺陷。该保证明确替代关于质量，描述，对任何特定目的的适用性，适销性，生产率或任何其他事项的所有其他明示或暗示的保证。R-Biopharm AG 对产品的正确使用不承担任何责任，并因此不承担法律或其他方式产生的所有其他明示或暗示的补救，保证，担保或责任，或与使用任何产品或服务有关的直接或间接损害，并且对任何利润损失概不负责。除非通过 R-Biopharm AG 授权代表签署的书面文书，否则本担保不可以扩展，更改或更改。