组胺含量检测试剂盒说明书

微量法

规格：100T/48S

产品组成：使用前请认真核对试剂体积与瓶内体积是否一致，有疑问请及时联系本公司工作人员。

试剂名称	规格	保存条件
提取液一	液体 60 mL×1 瓶	2-8℃保存
提取液二	液体 10 mL×1 瓶	2-8℃保存
试剂一	液体 25 mL×1 瓶	2-8℃保存
试剂二	粉剂×1 支	2-8℃保存
试剂二稀释液	液体 2.5 mL×1 瓶	2-8℃保存
试剂三	液体 8 mL×1 瓶	2-8℃保存
粉剂一	粉剂 3 g×1 瓶	2-8℃保存
标准品	液体 1 mL×1 支	2-8℃保存

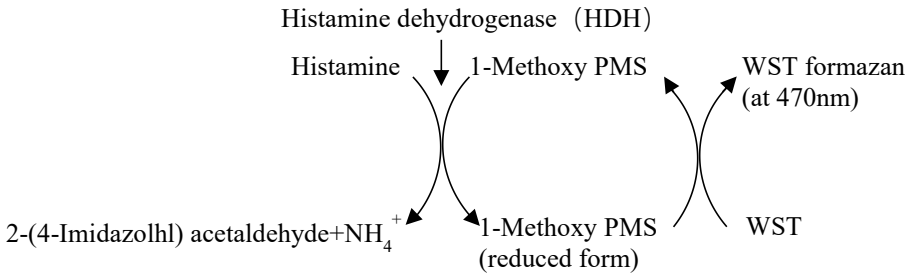
溶液的配制：

1. 试剂二：临用前加入65μL**蒸馏水**溶解，2-8℃可保存4周（该试剂为**冻干**试剂，可能存在不同瓶间肉眼观察试剂量相差较大甚至量很少的现象，此现象不影响使用，实际质量相同）。
2. 试剂二工作液的配制：根据样本量按照试剂二：**试剂二稀释液**=10μL：300μL（共310μL，约10S）的比例配制，现配现用。
3. 标准品：10μmol/mL组胺标准液。
4. 0.1875μmol/mL标准品配制：取75μL10μmol/mL组胺标准液，加入925μL蒸馏水，混匀配制成0.75μmol/mL的组胺标准品；再吸取250μL 0.75μmol/mL组胺和750 μL蒸馏水混合配制成0.1875μmol/mL的组胺标准溶液备用。

产品说明：

组胺（Histamine）是一种有潜在危害的含氮低分子量有机化合物，是由组氨酸在脱羧酶的作用下产生的。当组织受到损伤或发生炎症和过敏反应时，都可释放组胺。组胺广泛存在于各种食品中，摄入过量的组胺会对人体产生危害。

组胺会被组胺脱氢酶（HDH）特异性分解，在1-mPMS作用下，电子转移通过WST显色，在470nm下有最大吸收峰，据此可以计算组胺含量。



注意：实验之前建议选择 2-3 个预期差异大的样本做预实验。

需自备的仪器和用品：

可见分光光度计/酶标仪、低温离心机、微量玻璃比色皿/96孔板、可调式移液枪、匀浆器/研钵、水浴锅/恒温培养箱、冰和蒸馏水。

操作步骤：

一、样本处理（可适当调整待测样本量，具体比例可以参考文献）

1. 组织：按照质量（g）：提取液一体积（mL）为1：2.5~5的比例（建议称取约0.2g，加入1mL提取液一）加入提取液一，冰浴匀浆后，于60℃水浴30min，冷却至室温后于4℃ 10000g离心10min，取0.8mL上清液，再缓慢加入0.15mL提取液二，缓慢吹打混匀至无气泡产生，4℃ 10000g离心10min后取上清待测。
2. 红酒等（酚类含量高）液体：称取粉剂一0.05g，加入500μL液体样本和500μL提取液一，冰浴匀浆后，于60℃水浴30min，冷却至室温后于4℃ 12000g离心10min，取0.8mL上清液，再缓慢加入0.15mL提取液二，缓慢吹打混匀至无气泡产生，4℃ 10000g离心10min后取上清待测。

注：1、提取液二需缓慢加入，加入后会产生大量气泡，建议使用2mL EP管进行操作。

2、样本提取后尽可能在2小时内测定结束，若样本量过多建议分批次处理。

3、含酚类高的样本，前处理时加入粉剂一约0.05g，与样本一起冰浴匀浆。如红酒，前处理时取500μL液体样本加入500μL提取液一，和粉剂一约0.05g（无需准确称量），之后按照液体样本继续进行冰浴匀浆后等后续处理。

二、测定步骤

1、可见分光光度计/酶标仪预热30min以上，调节波长至470nm，分光光度计用蒸馏水调零。

2、试剂一37℃预热15min。

3、操作表：（在1.5mL EP管或96孔板中依次加入以下试剂）

试剂名称（μL）	测定管	对照管	空白管	标准管
试剂一	195	225	195	195
试剂二工作液	30	-	30	30
试剂三	45	45	45	45
蒸馏水	-	-	30	-
样本	30	30	-	-
标准品	-	-	-	30

充分混匀，37℃**避光**反应15min，于微量玻璃比色皿/96孔板中，测定470nm处吸光值A，记为A测定、A对照、A空白、A标准，计算ΔA测定=A测定-A对照，ΔA标准=A标准-A空白。空白管和标准管只需测1-2次。

三、组胺含量的计算

1. 按照蛋白浓度计算

组胺含量(μmol/mg prot)=ΔA测定×C标准÷ΔA标准×V样本÷(V样本×Cpr)×F

=0.1875×ΔA测定÷ΔA标准×Cpr×F

C标准：标准管浓度，0.1875μmol/mL；V样本：加入的样本体积，0.03mL；Cpr：样本蛋白质浓度，mg/mL，蛋白浓度需自行测定；F：稀释倍数。

2. 按照样本质量计算

组胺含量(μmol/g 质量)=ΔA测定×C标准÷ΔA标准×(V上清+V提取液二)÷(W×V上清÷V提取液一)×F =0.223×ΔA测定÷ΔA标准÷W×F

C标准：标准管浓度，0.1875μmol/mL；W：样本质量，g；V上清：提取时上清液体积，0.8mL；V提取液二：加入的提取液二体积，0.15mL；V提取液一：加入的提取液一体积，1mL；F：稀释倍数。

3. 按照液体体积计算

组胺含量(μmol/mL)

=ΔA测定×C标准÷ΔA标准×(V上清+V提取液二)÷ [V液体×V上清÷(V提取液一+V液体)] ×F

=0.445×ΔA测定÷ΔA标准×F

C标准：标准管浓度，0.1875μmol/mL；V上清：提取时上清液体积，0.8mL；V提取液二：加入的提取液二体积，0.15mL；V提取液一：加入的提取液一体积，0.5mL；V液体：液体样本体积，0.5mL；F：稀释倍数。

注意事项：

1. 提取液一中含有蛋白质沉淀剂，因此上清液不能用于蛋白浓度测定。如需测定蛋白含量，需另取组织。
2. 如果样本测定吸光值小于 0.05 或接近空白管吸光值，可适当增大样本量，空白管和标准管也需要进行相应调整。
3. ΔA 测定大于 1 或者 A 测定大于 1.5 时，可用蒸馏水稀释样本进行测定。