

畜禽饲料中伏马菌素 B1 的测定 —酶联免疫吸附法

Determination of fumonisin B1 in animal foodstuff—Enzyme linked immunosorbent
assay

<http://bzxx.ahbz.org.cn>

仅供学习交流使用，请勿传播或其他用途

2014 - 12 - 17 发布

2015 - 01 - 17 实施



<http://bzxx.ahbz.org.cn>
仅供学习交流使用，请勿传播或其他用途

前 言

本标准按照 GB/T 1.1-2009 给出的规则起草。

本标准有安徽农业大学提出。

本标准起草单位：安徽农业大学、和县畜牧兽医局、马鞍山市农业委员会。

本标准起草人：王希春、佘兆法、吴金节、夏效平、陈祥国、李复辉、樊海新、李玉、冯士彬、李贺侠、张宁。



<http://bzxx.ahbz.org.cn>

仅供学习交流使用，请勿传播或其他用途



<http://bzxx.ahbz.org.cn>

仅供学习交流使用，请勿传播或其他用途

畜禽饲料中伏马菌素 B₁ 的测定-酶联免疫吸附法

1 范围

本标准规定了畜禽饲料中伏马菌素B₁ 的酶联免疫吸附法测定的术语和定义、原理、设备、试剂、检测步骤。

本方法适用于饲料原料或配合饲料中伏马菌素B₁ 的测定。

本方法的最低检测限为 10 μg/kg。

2 规范性引用文件

下列文件对于本文件的应用是必不可少的。凡是注日期的引用文件，仅所注日期的版本适用于本文件。凡是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 分析实验室用水规格和试验方法

GB/T 14699.1 饲料 采样

3 术语和定义

下列术语和定义适用于本文件。

3.1

伏马菌素 B₁ fumonisin B₁, FB₁

伏马菌素B₁ 是由串珠镰刀菌代谢产生的一种真菌毒素。

4 原理

待检样品中的抗原和一定量的酶标抗原竞争与固相抗体结合，如待检样品中无抗原，则酶标抗原能顺利地与固相抗体结合。如待检样品中含有抗原，则与酶标抗原以同样的机会与固相抗体结合。待检样品中抗原含量愈多，结合在固相抗体上的酶标抗原愈少，则其最后加入酶底物后显色也愈浅。颜色的深浅与待检样品中抗原含量成反线性相关。

5 设备

5.1 粉碎机（DYF-500）

5.2 分析天平（精确到 0.001 g）

5.3 涡旋混匀器（SZ-1）

5.4 酶标仪（MK3，波长 450 nm）

5.5 酶标板（48 孔或 96 孔）

5.6 单道微量移液器（10 μL、100 μL、1000 μL）

5.7 多道微量移液器 (300 μ L)

6 试剂

- 6.1 本检测方法所用试剂, 凡未指明规格者, 均为分析纯, 水为 GB/T 6682 规定的一级水。
- 6.2 乙腈-水: 1:1 (V:V)
- 6.3 包被抗原 FB₁
- 6.4 FB₁ 单克隆抗体
- 6.5 HRP-羊抗小鼠 IgG
- 6.6 包被缓冲液: 碳酸钠 (Na_2CO_3) 1.59 g, 碳酸氢钠 (NaHCO_3) 2.93 g, 加水溶解, 调 pH 至 9.6, 定容至 1000 mL。
- 6.7 洗涤液 PBST: 磷酸二氢钾 (KH_2PO_4) 0.2 g, 磷酸氢二钠 ($\text{Na}_2\text{HPO}_4 \cdot 12\text{H}_2\text{O}$) 2.9 g, 氯化钠 (NaCl) 8 g, 氯化钾 (KCl) 0.2 g, 吐温-20 0.5 mL, 加水溶解, 调 pH 至 7.4, 定容至 1000 mL。
- 6.8 封闭液: 5%脱脂奶粉, 称取 5 g 脱脂奶粉, 加入洗涤液至 100 mL, 保存于 4℃冰箱中。
- 6.9 FB₁ 标准贮备溶液: 称取 1 mg FB₁ 标准品, 用乙腈水配制成约 1 mg/mL FB₁ 贮备液。贮备液置于 4℃冰箱中避光保存。
- 6.10 FB₁ 标准溶液: 精确吸取标定后的标准储备液, 用乙腈水新鲜配制成 FB₁ 标准溶液, 浓度分别为 2.5 ng/mL、5 ng/mL、10 ng/mL、50 ng/mL、100 ng/mL、250 ng/mL。
- 6.11 TMB 底物显色液
- A 液: 醋酸钠 ($\text{C}_2\text{H}_3\text{O}_2\text{Na}$) 13.6 g, 柠檬酸 ($\text{C}_6\text{H}_8\text{O}_7 \cdot \text{H}_2\text{O}$) 1.6 g, 30%双氧水 (H_2O_2) 0.3 mL, 加水至 500 mL。
 - B 液: 乙二胺四乙酸二钠 (EDTA) 0.2 g, 柠檬酸 ($\text{C}_6\text{H}_8\text{O}_7 \cdot \text{H}_2\text{O}$) 0.95 g, 甘油 ($\text{C}_3\text{H}_8\text{O}_3$) 50 mL, TMB 0.15 g, 加水至 500 mL。
- 使用前, A 液和 B 液按 1:1 混合使用。
- 6.12 终止液: 2 mol/L H_2SO_4 溶液。

7 检测步骤

7.1 样品

饲料原料或配合饲料。

7.2 试样制备

按 GB/T 14699.1 饲料采样方法取得试样 800 g, 四分法缩减至 100 g, 磨碎, 并通过 0.90 mm 孔径分子筛。

7.3 毒素提取

7.3.1 称取 20 g 粉碎并通过 0.90 mm 孔径的分子筛的试样, 置于 250 mL 具塞锥形瓶中, 加入 100 mL 乙腈水溶液, 振荡 30 min, 静置后取上清, 滤纸过滤。

7.3.2 分装滤液, -20℃保存待测。

7.4 检测

7.4.1 将抗原用包被液稀释至需要浓度, 在 96 孔酶标板上加入 100 μ L, 4℃过夜。

- 7.4.2 酶标板用 PBST 洗涤 3 次, 每次 3 min, 拍干。
- 7.4.3 加入 100 μL 封闭液, 37 $^{\circ}\text{C}$ 1 h。
- 7.4.4 PBST 洗涤 3 次, 每次 3 min, 拍干。
- 7.4.5 每孔分别加入不同浓度 FB_1 标准品溶液、样品提取液 50 μL , 抗体液 50 μL , 空白对照孔加入 100 μL 抗体液, 37 $^{\circ}\text{C}$, 1 h。
- 7.4.6 PBST 洗涤 3 次, 每次 3 min, 拍干
- 7.4.7 加入 100 μL 酶标二抗, 37 $^{\circ}\text{C}$, 1 h。
- 7.4.8 PBST 洗涤 3 次, 每次 3 min, 拍干。
- 7.4.9 加入 100 μL A 液 B 液混合后底物溶液, 37 $^{\circ}\text{C}$, 1 h。
- 7.4.10 加入 50 μL 终止液, 终止反应。
- 7.4.11 用酶标仪在 450 nm 处测定吸光度值。

7.5 结果处理

7.5.1 绘制标准曲线

以不同浓度 FB_1 标准品浓度的对数为横坐标, 以 B/B_0 百分比为纵坐标 (B 为各竞争标准品浓度测得的 OD_{450} 值, B_0 为不含标准品时测得的 OD_{450} 值) 绘制标准曲线。

7.5.2 计算结果

所得实验数据按公式 (1) 计算:

$$W = \frac{cVX}{M} \dots\dots\dots (1)$$

式中:

W —— 伏马菌素 B_1 的浓度, ng/g;

c —— 酶标板上测得的 FB_1 的浓度 (根据标准曲线求得), ng/mL;

V —— 样品提取液的体积, mL;

X —— 样品提取液稀释倍数;

M —— 样品质量, g;

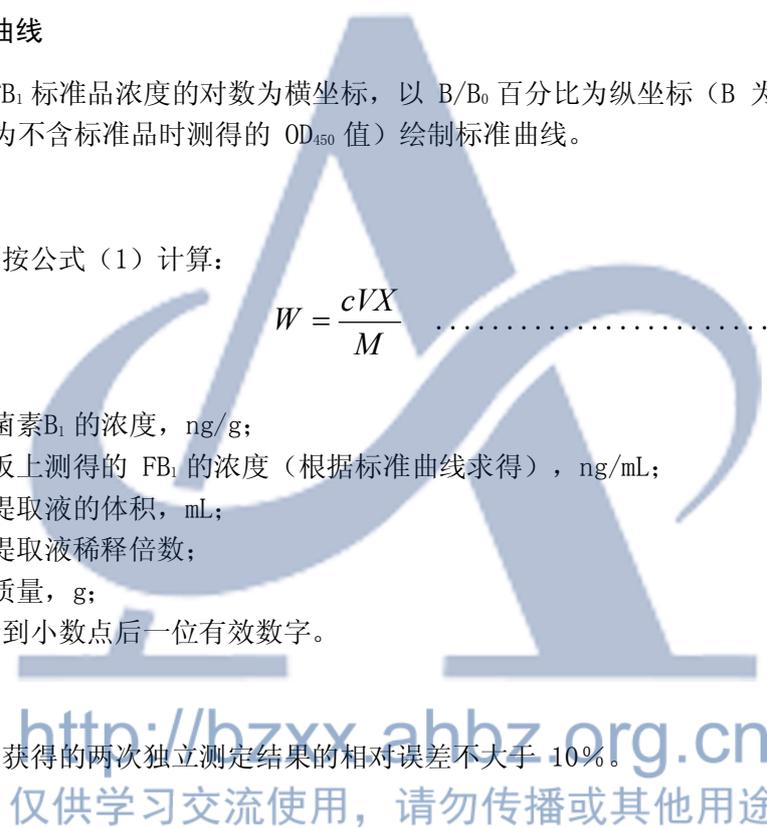
计算结果表示到小数点后一位有效数字。

7.6 重复性

在相同条件下获得的两次独立测定结果的相对误差不大于 10%。

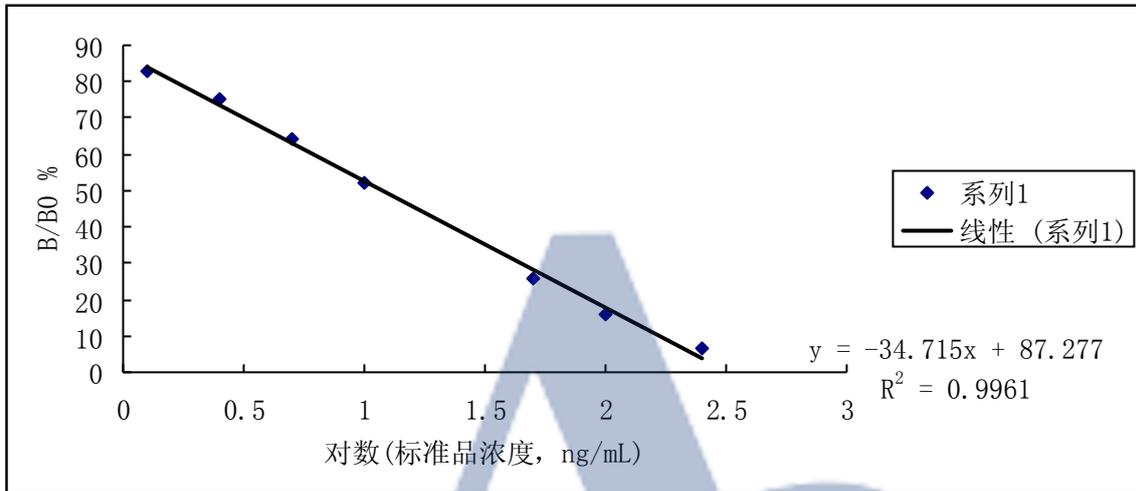
7.7 回收率

本方法的回收率为 83%~96%。



附录 A
(资料性附录)
伏马菌素 B₁ 标准品的标准曲线

伏马菌素 B₁ 标准品的标准曲线见图 A. 1。



图A. 1 伏马菌素 B₁ 标准品的标准曲线图

<http://bzxx.ahbz.org.cn>

仅供学习交流使用，请勿传播或其他用途