

SN

中华人民共和国出入境检验检疫行业标准

SN/T 4543.1—2016
代替 SN/T 2060—2008

商品化试剂盒检测方法 泰乐菌素 方法一

Commercial kit method—
Tylosin—Test method I

2016-08-23 发布

2017-03-01 实施



中 华 人 民 共 和 国
国家质量监督检验检疫总局 发 布

前 言

本部分为 SN/T 4543 中第 1 部分。

本部分按照 GB/T 1.1—2009 给出的规则起草。

本部分代替了 SN/T 2060—2008《出口蜂王浆中泰乐菌素残留量测定方法 酶联免疫法》。

本部分与 SN/T 2060—2008 主要技术变化如下：

——标准名称由《出口蜂王浆中泰乐菌素残留量测定方法 酶联免疫法》改为《商品化试剂盒检测方法 泰乐菌素 方法一》。

——附录中增加了试剂盒的评估结果。

请注意本文件的某些内容可能涉及专利。本文件的发布机构不承担识别这些专利的责任。

本部分由国家认证认可监督管理委员会提出并归口。

本部分起草单位：中华人民共和国浙江出入境检验检疫局、浙江迪恩科技有限公司产品。

本部分主要起草人：帅江冰、张晓峰、吴姗、邵宏宏、李可、王旻子。

本部分所代替标准的历次版本发布情况为：

——SN/T 2060—2008。

商品化试剂盒检测方法

泰乐菌素

方法一

1 范围

SN/T 4542 的本部分规定了蜂王浆和王浆粉中泰乐菌素残留量的酶联免疫测定方法。
本部分适用于蜂王浆和王浆粉中泰乐菌素残留量的筛选测定。

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

SN/T 2775 商品化食品检测试剂盒评价方法

3 方法提要

本部分以酸性的庚烷磺酸钠缓冲液来提取蜂王浆中残留的泰乐菌素,沉淀王浆中蛋白后并调节 pH 至 7.0 处理后,样品中残留的泰乐菌素与酶标记泰乐菌素共同竞争结合至包被在微孔板上的绵羊抗兔抗体,通过洗涤除去未结合的泰乐菌素和酶标记泰乐菌素,然后加入底物显色,用酶标仪测定吸光度,根据吸光度值得出试样中泰乐菌素的含量。

4 试剂和材料

除注明外,所有试剂均为分析纯,水为 GB/T 6682 规定的一级水。

4.1 泰乐菌素检测试剂盒。

本试剂盒按照 SN/T 2775 由国家认监委商品化食品检测试剂盒评价专家委员会评价。具体评价参见附录 A。试剂盒组成如下:

- 预包被抗体的 96 孔板:12 条×8 孔。
- 泰乐菌素标准溶液:0 ng/mL、0.2 ng/mL、0.625 ng/mL、2.5 ng/mL、10.5 ng/mL、50 ng/mL。
- 泰乐菌素酶标记物溶解液。
- 泰乐菌素酶标记物冻干粉:根据泰乐菌素试剂盒中说明,可用泰乐菌素酶标记物溶解液配制成泰乐菌素酶标记物溶液。
- 显色剂。
- 样品稀释液:根据泰乐菌素试剂盒中说明,可用蒸馏水 10 倍稀释后使用。
- 浓缩清洗液(10 倍浓缩):可用水稀释后使用。
- 反应终止液。

试剂盒应在 2℃~8℃避光条件下保存。

4.2 磷酸钠($\text{Na}_3\text{PO}_4 \cdot 12\text{H}_2\text{O}$)。

4.3 庚烷磺酸钠 $[\text{CH}_3(\text{CH}_2)_6\text{SO}_3\text{Na}]$ 。

4.4 磷酸。

4.5 磷酸氢钠($\text{Na}_2\text{HPO}_3 \cdot 12\text{H}_2\text{O}$)。

4.6 甲醇。

4.7 庚烷磺酸钠缓冲液:称取 11.4 g 磷酸钠(4.2)和 10.1 g 庚烷磺酸钠(4.3),用蒸馏水定容到 1 L,用磷酸调节 pH 至 2.0。

4.8 磷酸盐缓冲液:称取磷酸氢钠(4.5)34 g,用蒸馏水定容到 1 L,调节 pH 至 8.0。

4.9 泰乐菌素标准物质:纯度 $\geq 98\%$ 。

4.10 泰乐菌素标准品溶液的配制:用甲醇(4.6)作为溶剂配制成 400 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 的储存液,于 $-20\text{ }^\circ\text{C}$ 条件下保存。

5 仪器和设备

5.1 酶标仪。

5.2 八道移液器:10 μL ~100 μL 。

5.3 单道移液器:10 μL ~100 μL ,100 μL ~1 000 μL 和 2 mL~10 mL。

5.4 混合振荡器。

5.5 高速低温离心机:6 000 r/min。

5.6 具塞试管:50 mL。

5.7 电子天平:0.01 g~100 g。

5.8 酸度计:精确到 0.1。

6 试样的制备与保存

6.1 试样的制备

原始样品总量不得少于 200 g,蜂王浆充分搅拌均匀后,将样品分成两等份;冻干粉采用四分法,将样品分成两等份。分好的样品装入洁净容器,加封并做标识。

6.2 试样的保存

将样品于 $-20\text{ }^\circ\text{C}$ ~ $-18\text{ }^\circ\text{C}$ 条件下保存。

7 分析步骤

7.1 试样的提取

称取 2.0 g 蜂王浆样品,置于 50 mL 具塞试管中,加入 6 mL(精确到 0.1 mL)庚烷磺酸钠缓冲液(4.7),充分振荡,15 $^\circ\text{C}$ 下 6 000 r/min 离心 10 min 直至清亮,取 0.5 mL 上清液于一干净试管,加入 0.5 mL 磷酸盐缓冲液(4.8),混合均匀;用磷酸(4.4)调节 pH 至 6.8~7.2,此溶液即可供 ELISA 检测用。最后稀释倍数为 8。王浆冻干粉则用水以 1:2 比例稀释,充分浸泡(2 h 以上)后,称取 2.0 g 按照上述王浆前处理方法进行提取,最后稀释倍数为 24。

7.2 测定条件

7.2.1 操作条件

所有操作应在室温下(20℃~24℃)进行,泰乐菌素试剂盒中所有试剂的温度均应回升至室温(20℃~24℃)后方可使用。

7.2.2 洗板条件

人工洗涤次数5次以上,每次注水量为250 μL;自动洗板可以预定5次周期。

7.2.3 酶标仪测定条件

酶标仪测定波长为450 nm。

7.3 测定步骤

7.3.1 将测定需用的微孔板备齐并插入微孔架上,记录标准品及样品等在微孔架上的位置。

7.3.2 吸取50 μL泰乐菌素标准溶液(浓度分别为:0 ng/mL、0.3 ng/mL、0.6 ng/mL、1.25 ng/mL、2.5 ng/mL、5 ng/mL、10 ng/mL、25 ng/mL)于孔A1、A2—H1、H2;吸取50 μL样品溶液于其余微孔中。

7.3.3 吸取100 μL泰乐菌素酶标记物溶液于每一个微孔。用封口膜封孔条,并持微孔板在台面上以圆周运动方式混匀,室温(20℃~25℃)下避光孵育10 min(温育过程中晃动/振动反应板)。

7.3.4 倒出孔中的液体,将微孔架反扣在吸水纸上反复拍打,以除去孔中过多的残液,但不能使微孔干燥。然后立即用洗涤缓冲液按7.2.2条件进行洗板。要注意不能使微孔干燥。

7.3.5 迅速加入100 μL显色剂于每一个微孔底部,然后,持微孔板在台面上以圆周运动方式混匀后,室温(20℃~25℃)下避光孵育10 min。

7.3.6 迅速加入100 μL反应终止液于每一个微孔,然后,持微孔板在台面上以圆周运动方式混匀后,将微孔架置于酶标仪中,在450 nm处测量吸光度(加入反应终止液后应在30 min内读取吸光度)。

7.4 平行试验

按以上步骤,对同一标准溶液、同一样品溶液均应进行2孔平行试验测定。

7.5 空白试验

除不称取试样外,均按上述步骤进行。

7.6 阳性质控

每次测定均应做一个添加泰乐菌素标准品溶液(4.10)的样品,以确定实验过程的操作准确性。

8 结果计算

标准品和样品的OD平均值除以零标准(A1、A2)的平均OD值,再乘以100,计算出各标准液和样品的百分比吸光度值。零标准为100%(最大百分比吸光度值),其他OD值为最大吸光度值的百分数。

以百分比吸光度值(B/B_0)为纵坐标(%),泰乐菌素标准溶液浓度(ng/mL)为横坐标,绘制标准工作曲线。从标准工作曲线上得到试样中相应的泰乐菌素浓度后,结果按式(1)进行计算:

$$X = \frac{c \times V \times 1\,000}{m \times 1\,000} \dots\dots\dots (1)$$

SN/T 4543.1—2016

式中:

X ——样品中泰乐菌素的残留量,单位为微克每千克($\mu\text{g}/\text{kg}$);

c ——从标准工作曲线上得到的样品中泰乐菌素浓度,单位为纳克每毫升(ng/mL);

V ——样品溶液的最终定容体积,单位为毫升(mL);

m ——样品溶液所代表的最终试样质量,单位为克(g)。

也可以用各种酶标仪的数据处理软件进行计算。所得结果表示至一位小数。

9 确证试验

如被测样品中泰乐菌素残留量的值大于限量要求时,应用其他方法进行确证。

10 方法性能指标

10.1 检出限和定量限

检出限 $4.0 \mu\text{g}/\text{kg}$,定量限 $12.0 \mu\text{g}/\text{kg}$ 。

10.2 交叉反应率

泰乐菌素 100%,四环素 $<0.1\%$,氨苄青霉素 $<0.1\%$,庆大霉素 $<0.1\%$,卡那霉素 $<0.1\%$ 。

附 录 A
(资料性附录)

泰乐菌素试剂盒评价结果¹⁾

A.1 线性:泰乐菌素的线性范围均为 0.2 ng/mL~50 ng/mL,相关系数 $R \geq 0.98$ 。

A.2 交叉反应率:泰乐菌素 100%,四环素 $<0.1\%$,氨苄青霉素 $<0.1\%$,庆大霉素 $<0.1\%$,卡那霉素 $<0.1\%$ 。

A.3 检出限和定量限:检出限 4.0 $\mu\text{g/kg}$,定量限 12.0 $\mu\text{g/kg}$ 。

1) 本评价结果仅适用于浙江迪恩生物科技股份有限公司的泰乐菌素试剂盒。



中华人民共和国出入境检验检疫
行 业 标 准
商品化试剂盒检测方法
泰乐菌素
方法一

SN/T 4543.1—2016

*

中国标准出版社出版
北京市朝阳区和平里西街甲2号(100029)
北京市西城区三里河北街16号(100045)
总编室:(010)68533533
网址 www.spc.net.cn

中国标准出版社秦皇岛印刷厂印刷

*

开本 880×1230 1/16 印张 0.75 字数 12 千字
2018年1月第一版 2018年1月第一次印刷
印数 1—500

*

书号: 155066·2-32440 定价 16.00 元



SN/T 4543.1—2016