



中华人民共和国国家标准

GB/T 17480—2008
代替 GB/T 17480—1998

饲料中黄曲霉毒素 B₁ 的测定 酶联免疫吸附法

Determination of aflatoxin B₁ in animal feeding stuffs—
Enzyme-linked immunosorbent assay

2008-11-21 发布

2009-02-01 实施

中华人民共和国国家质量监督检验检疫总局
中国国家标准化管理委员会 发布

前 言

本标准代替 GB/T 17480—1998《饲料中黄曲霉毒素 B₁ 的测定 酶联免疫吸附法》。

本标准与 GB/T 17480—1998 相比主要修改如下：

- 范围中增加“本标准检出限为 0.1 μg/kg”；
- 规范性引用文件中，用“GB/T 20195 动物饲料 试样的制备”代替“GB/T 8381—1987 饲料中黄曲霉毒素 B₁ 的测定方法”；
- 试剂盒组成中，增加“注意：不同测试盒制造商间的产品组成和操作会有细微的差别，应严格按照说明书要求规范操作”；
- 仪器、设备条款中，删除冰箱条款；增加电动振荡器、具塞磨三角瓶；
- 将“取样”条款改为“试样制备”，同时将“按 GB/T 8381—1987 中 5.1 要求采集、处理样品，制成分析用的试样”改为“按 GB/T 20195 要求制备试样”；
- 限量测定条款中，将测定操作的分级条款合并为一个条款，并删除表格，均用文字叙述测定过程；
- 定量测定条款中增加“结果保留 2 位有效数字”；
- 原“其他”条款删除，将“凡接触 AFB₁ 的容器，需浸入 1%次氯酸钠(NaClO₂)溶液，12 h 后清洗备用。为分析人员安全，操作时要带上医用乳胶手套”改为“警告”条款；
- 增加了资料性附录 A；
- 将样品溶液稀释表及稀释倍数与结果计算表作为资料性附录 B。

本标准的附录 A 和附录 B 均为资料性附录。

本标准由全国饲料工业标准化技术委员会提出并归口。

本标准起草单位：江苏省微生物研究所有限责任公司。

本标准主要起草人：李利东、宓晓黎、袁建兴、杜姝莲。

本标准于 1998 年首次发布，本次为第一次修订。

饲料中黄曲霉毒素 B₁ 的测定

酶联免疫吸附法

1 范围

本标准规定了饲料中黄曲霉毒素 B₁ 的酶联免疫吸附测定(ELISA)方法。
本标准适用于各种饲料原料、配合饲料及浓缩饲料中黄曲霉毒素 B₁ 的测定。
本标准检出限为 0.1 μg/kg。

2 规范性引用文件

下列文件中的条款通过本标准的引用而成为本标准的条款。凡是注日期的引用文件,其随后所有的修改单(不包括勘误的内容)或修订版均不适用于本标准,然而,鼓励根据本标准达成协议的各方研究是否可使用这些文件的最新版本。凡是不注日期的引用文件,其最新版本适用于本标准。

GB/T 20195 动物饲料 试样的制备(GB/T 20195—2006,ISO 6498:1998,IDT)

3 原理

试样中黄曲霉毒素 B₁、酶标黄曲霉毒素 B₁ 抗原与包被于微量反应板中的黄曲霉毒素 B₁ 特异性抗体进行免疫竞争性反应,加入酶底物后显色,试样中黄曲霉毒素 B₁ 的含量与颜色成反比。用目测法或仪器法通过与黄曲霉毒素 B₁ 标准溶液比较判断或计算试样中黄曲霉毒素 B₁ 的含量。

4 试剂和材料

除非另有说明,在分析中仅使用确认为分析纯的试剂和蒸馏水或去离子水或相当纯度的水。

4.1 黄曲霉毒素 B₁ 酶联免疫测试盒中的试剂

注意:不同测试盒制造商间的产品组成和操作会有细微的差别,应严格按说明书要求规范操作。

4.1.1 包被抗黄曲霉毒素 B₁ 抗体的聚苯乙烯微量反应板。

4.1.2 样品稀释液:甲醇-蒸馏水(7+93)。

4.1.3 黄曲霉毒素 B₁ 标准溶液:1.00 μg/L、50.00 μg/L。

警告——凡接触黄曲霉毒素 B₁ 的容器,需浸入 1%次氯酸钠(NaClO₂)溶液,12 h 后清洗备用。为分析人员安全,操作时要带上医用乳胶手套。

4.1.4 酶标黄曲霉毒素 B₁ 抗原:黄曲霉毒素 B₁-辣根过氧化物酶交联物。

4.1.5 0.01 mol/L pH7.5 磷酸盐缓冲液的配制:称取 3.01 g 磷酸氢二钠(Na₂HPO₄ · 12H₂O)、0.25 g 磷酸二氢钠(NaH₂PO₄ · 2H₂O)、8.76 g 氯化钠(NaCl),加水溶解至 1 L。

4.1.6 酶标黄曲霉毒素 B₁ 抗原稀释液:称取 0.1 g 牛血清白蛋白(BSA)溶于 100 mL pH7.5 磷酸盐缓冲液(4.1.5)。

4.1.7 0.1 mol/L pH7.5 磷酸盐缓冲液:称取 30.1 g 磷酸氢二钠(Na₂HPO₄ · 12H₂O)、2.5 g 磷酸二氢钠(NaH₂PO₄ · 2H₂O)、87.6 g 氯化钠(NaCl),加水溶解至 1 L。

4.1.8 洗涤母液:吸取 0.5 mL 吐温-20 于 1 000 mL 0.1 mol/L pH 7.5 磷酸盐缓冲液(4.1.7)。

4.1.9 pH5.0 乙酸钠-柠檬酸缓冲液:称取 15.09 g 乙酸钠(CH₃COONa · 3H₂O)、1.56 g 柠檬酸(C₆H₈O₇ · H₂O),加水溶解至 1 L。

4.1.10 底物溶液 a:称取四甲基联苯胺(TMB) 0.2 g 溶于 1 L pH5.0 乙酸钠-柠檬酸缓冲液。