

备案号：18619-2006

DB36

江西省地方标准

DB36/T 484—2005

饲料中沙丁胺醇的测定-酶联免疫吸附法

2005-12-25 发布

2006-02-01 实施

江西省质量技术监督局 发布

目 次

前言	II
1 范围	1
2 方法原理	1
3 试剂和材料	1
4 仪器设备	1
5 样品的制备	1
6 分析步骤	1
7 结果计算	2
8 灵敏度	2
9 其他	2

前 言

本标准由江西省农业厅提出。

本标准起草单位：江西省兽药饲料监察所。

本标准起草人：文虹、周华娇、符金华、饶辉、尹腾桂、周伟良。

饲料中沙丁胺醇的测定-酶联免疫吸附法

1 范围

本标准规定了饲料中沙丁胺醇酶联免疫吸附测定(ELISA)方法。

本标准适用于配(混)合饲料、浓缩饲料、预混合饲料及饲料添加剂中沙丁胺醇的测定。

2 方法原理

利用固相酶联免疫吸附原理,将沙丁胺醇特异性抗体包被于聚苯乙烯微量反应板的孔穴中,再加入稀释的样品(未知抗原)及酶标沙丁胺醇的抗原(已知抗原),使两者与抗体之间进行免疫竞争反应,然后加酶底物显色,颜色的深浅取决于抗体和酶标沙丁胺醇抗原结合的量,即样品中沙丁胺醇多,则被抗体结合酶标沙丁胺醇少,颜色浅,反之则深,用目测法或仪器法与沙丁胺醇标样比较来判断样品中沙丁胺醇的含量。

3 试剂和材料

以下试剂除特别注明外均为分析纯,水为蒸馏水。

3.1 沙丁胺醇酶联免疫试剂盒

3.1.1 1×96孔板(12条×8孔)包被有抗沙丁胺醇的IgG抗体

3.1.2 6×标准液,(2ml)为分别含0,0.1,0.3,0.9,2.7,8.1ppb的SAL溶液

3.1.3 1×SAL过氧化物酶标记物浓缩溶液

1×酶反应底物 (7 ml):含有过氧化尿素

1×显色剂 (7 ml):四甲基联苯胺

1×反应停止液 (8 ml):1N 盐酸

1×PBS (15 ml):用于稀释SAL—过氧化物酶标记物浓缩溶液

1×PBST浓缩液 (40 ml):加800mL蒸馏水稀释,洗板用

3.2 1mol/L 盐酸

3.3 1mol/L 氢氧化钠

4 仪器设备

4.1 实验室常用仪器设备

4.2 酶标测定仪,含有450nm的滤光片

4.3 振荡器:振荡频率100次/min(往复)

4.4 离心机能达到4000rpm

4.5 微量连续可调移液器及配套吸头10-300/ μ L

5 样品的制备

5.1 取具有代表性的饲料样品,用四分法缩减至200g左右,粉碎过0.45mm孔径的筛,充分混匀,装入磨口瓶备用。

6 分析步骤

6.1 提取

称取样品2g，精确至0.01g，置于50mL试管中，加入2mL1mol/LHCl及16mL蒸馏水混匀，振荡15min，然后4000rpm离心20min，转移出上清液并加入1MNaOH至上清液中混合，调PH值在6.5-7.5之间，静置15min后，再4000rpm离心20min转移出上清液备用。

6.2 测定

6.2.1 试剂盒和待测样品检测前平衡至室温（20℃-25℃）。

6.2.2 将足够标准和样品所用数量的孔条插入微孔架，标准和样品做两个平行实验，记录下标准和样品的位置，倒出孔中的抗体液，用稀释好的PBST洗涤三次，每次洗板应加入洗液后等2min再倒掉。

6.2.3 加入50μl的标准液或处理好的样品到各自微孔中。

6.2.4 加入100μl稀释的酶标记物到微孔中，25℃-30℃孵育30min。

6.2.5 倒出孔中的液体，用250μl稀释后的PBST洗涤三次，每次加入洗板液后等2min后再倒掉。

6.2.6 反应物与显色剂1:1混合后加入100μl到微孔中，充分混合并在25℃-30℃暗处孵育15min。

6.2.7 加入50μl反应停止液在10min内读取吸光度值。

7 结果计算

7.1 所获得的标准和样品吸光度值和平均值除以第一个标准（0标准）的吸光度值再乘以100，因此0标准等于100%，并且以百分比的形式给出吸光度值。

$$\frac{\text{标准的吸光度值（或样品）} \times 100}{0 \text{ 标准的吸光度值}} = \% \text{ 吸光度值}$$

7.2 计算的标准值绘成一个对应沙丁胺醇浓度（0ng/g或ng/mL）的半对数坐标系统曲线图，校正曲线在0.3-2.7ng/g（ppb）范围内应当成为线性，相对应每一个样品的浓度（ng/g或ng/mL）可以从校正曲线上读出。

7.3 以0.9ng/g的标准孔为对照孔，样品吸光度值小于该孔的吸光度值为可疑阳性。

8 灵敏度

本方法的检测限为0.1ng/g

9 其他

9.1 试剂盒应放在2℃-8℃冰箱内保存。

9.2 为分析人员安全，操作时要戴上医用乳胶手套。

9.3 本方法检出的可疑阳性样品必须经过GC-MS法进一步确证。