ICS 65.120
CCS B46

DB32

江 苏 省 地 方 标 准

DB 32/T 4367—2022

饲料中脱氧雪腐镰刀菌烯醇的测定 时间分辨荧光免疫层析定量法

Determination of deoxynivalenol in feeds

Time resolved fluorescence immunochromatography quantitative method

2022－09－06 发布　　2022－10－06 实施

江苏省市场监督管理局　　发 布

目　　次

前　　言 III
1 范围 1
2 规范性引用文件 1
3 术语和定义 1
4 原理 1
5 试剂和材料 2
6 仪器和设备 3
7 样品制备 3
8 样品前处理 3
9 标准曲线制定 3
10 检测过程 3
11 结果计算 4
12 方法性能 4

前　言

本文件按照GB/T 1.1—2020《标准化工作导则　第1部分：标准化文件的结构和起草规则》的规定起草。

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专利的责任。

本文件由江苏省畜牧业标准化技术委员会提出并归口。

本文件起草单位：江苏省家禽科学研究所、上海雄图生物科技有限公司。

本文件主要起草人：施寿荣、汪劲能、张鹏飞、肖蕴祺、胡艳、邵丹、沈一茹、张珊、王强。

饲料中脱氧雪腐镰刀菌烯醇的测定
时间分辨荧光免疫层析定量法

1 范围

本文件规定了饲料中脱氧雪腐镰刀菌烯醇测定的原理、试剂和材料、仪器和设备、样品制备、样品前处理、标准曲线制定、检测过程、结果计算和方法性能。

本文件适用于饲料原料、浓缩饲料、配合饲料、精料补充料等试样中脱氧雪腐镰刀菌烯醇的测定。

2 规范性引用文件

下列文件中的内容通过文中的规范性引用而构成本文件必不可少的条款。其中，注日期的引用文件，仅该日期对应的版本适用于本文件；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

GB/T 20195 动物饲料 试样的制备

3 术语和定义

下列术语和定义适用于本文件。

3.1

时间分辨荧光微球 time resolved fluorescent microsphere

形状为球形，直径在几纳米至几十微米之间，微球表面或内部负载有荧光物质，在受到一定的能量激发时能够发出荧光的微粒，比普通荧光半衰期长。微球表面修饰有合适密度的羧基或其它功能基团，用于与蛋白或抗体的共价偶联；微球所包理的镧系稀土元素经过了螯合，无需解离增强步骤。

3.2

时间分辨荧光免疫层析定量法 time resolved fluorescence immunochromatography quantitative method

4 原理

试样中脱氧雪腐镰刀菌烯醇与时间分辨荧光微球标记的特异性抗体结合后，抑制了层析过程中标记抗体与试纸条 T 线脱氧雪腐镰刀菌烯醇抗原的免疫反应，使 T 线时间分辨荧光强度降低，质控线 C 线结合的荧光标记物浓度与样品中玉米赤霉烯酮的浓度无关。层析结束后，通过仪器检测计算试纸条 T 线和 C 线的时间分辨荧光强度比值和设定的标准曲线进行准确定量分析。

5 试剂和材料

除另有规定外，本方法所用试剂均为分析纯，水为GB/T 6682规定的二级水。

5.1 十二水磷酸氢二钠（$Na_2HPO_4·12H_2O$）。

5.2 磷酸二氢钾（KH_2PO_4）。

5.3 氯化钾（KCl）。

5.4 氯化钠（NaCl）。

5.5 盐酸（HCl）。

5.6 甲醇（CH_3OH）。

5.7 蔗糖（$C_{12}H_{22}O_{11}$）。

5.8 牛血清白蛋白（BSA）：纯度≥98%。

5.9 吐温-20（$C_{58}H_{114}O_{26}$）。

5.10 磷酸盐缓冲溶液：取 2.178 g 磷酸氢二钠（5.1）、0.144 g 磷酸二氢钾（5.2）、0.12 g 氯化钾（5.3）、4.8 g 氯化钠（5.4），溶解于 1 L 水中，用适量盐酸（5.5）调 pH 至 6.8～7.2。

5.11 提取液：取 800 mL 甲醇（5.6）用纯水定容至 1 L，用于样品提取。

5.12 稀释液：在 1 L 磷酸盐缓冲溶液（5.10）中分别加入 2.5 g 蔗糖（5.7）、1.0 g 牛血清白蛋白（5.8）和 2.0 g 吐温-20（5.9）混匀，用于样品上清的稀释。

5.13 脱氧雪腐镰刀菌烯醇标准溶液：浓度 200 mg/L。

5.14 脱氧雪腐镰刀菌烯醇标准储备液：取脱氧雪腐镰刀菌烯醇标准溶液（5.13）1 mL 于 2 mL 容量瓶中，用甲醇（5.6）定容，混合均匀，制备成浓度为 100 mg/L 的储备液。

5.15 ID 卡：用于存储标准曲线和项目信息，直接插入荧光免疫定量分析仪使用。

5.16 脱氧雪腐镰刀菌烯醇时间分辨荧光免疫层析定量试纸条（图 1）：灵敏度不低于 100 μg/kg。试纸条结构图如下：

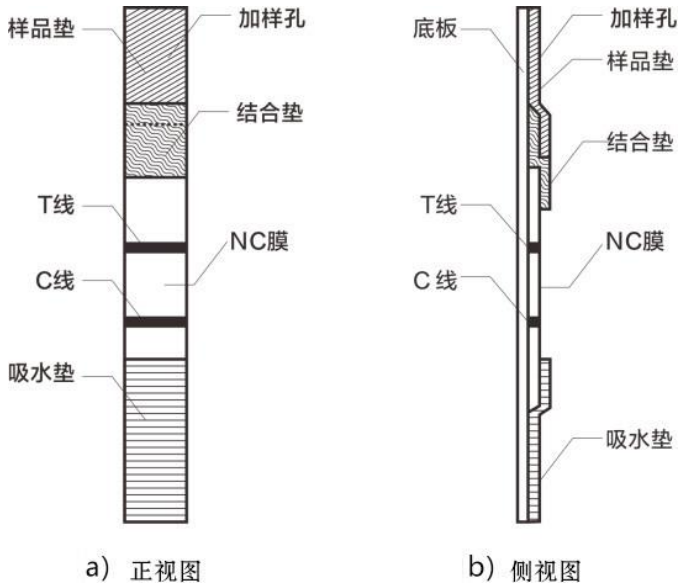

图1 脱氧雪腐镰刀菌烯醇时间分辨荧光免疫层析定量试纸条结构示意图

注：结合垫包被荧光微球标记的脱氧雪腐镰刀菌烯醇抗体，T 线包被脱氧雪腐镰刀菌烯醇封闭抗原，C 线包被二抗。

5.17　阴性样本：玉米基质空白样本，呕吐毒素含量＜25 μg/kg。

6　仪器和设备

6.1　天平：感量 0.01 g，最大量程 500 g。
6.2　涡旋振荡器：0 r/min～2500 r/min。
6.3　离心机：转速≥4000 r/min。
6.4　微量可调移液器：20μL～200 μL，0.1 mL～1 mL。
6.5　干式恒温孵育器：37.0℃ ± 2.0℃（不带鼓风）。
6.6　时间分辨荧光免疫定量分析仪：激发波长：365 nm ± 5 nm、发射波长：615 nm ± 5 nm，用于读取试纸条的荧光信号并自动计算定量的检测结果。

7　样品制备

按 GB/T 14699.1 取样，按照 GB/T 20195 制样备用。

8　样品前处理

8.1　称取 1.0 g ± 0.02 g 样品于 10 mL 离心管中，用移液器（6.4）加入 5 mL 提取液（5.11），用涡旋振荡器（6.2）振荡提取 5 min，用离心机（6.3）4000 r/min 离心 1 min，上清备用；如果样品浓度过高，用提取液（5.11）稀释。
8.2　取 100 μL 样品提取液（8.1），加入到 600 μL 稀释液（5.12），混匀后待点样检测。

9　标准曲线制定

9.1　空白基质溶液制备：取 10 g 阴性样品于 100 mL 离心管中，加入 50 mL 提取液（5.11），用涡旋振荡器（6.2）振荡提取 5 min，用离心机（6.3）4000 r/min 离心 1 min，上清备用。
9.2　分别吸取脱氧雪腐镰刀菌烯醇标准储备液（5.14）0.000 mL、0.004 mL、0.010 mL、0.020 mL、0.060 mL、0.120 mL、0.200 mL、0.300 mL、0.400 mL 于 5 mL 容量瓶中，用空白基质溶液（9.1）定容，分别相当于 0 ng/mL、20 ng/mL、50 ng/mL、100 ng/mL、300 ng/mL、600 ng/mL、1000 ng/mL、1500 ng/mL 和 2000 ng/mL 浓度标准工作溶液。
9.3　取 100 μL 标准工作液（9.2）分别加入 600 μL 稀释液（5.12），混匀后由低浓度到高浓度进行检测（10）。仪器软件可根据 T 线信号值与 C 线信号值的比值（T/C）和标准工作溶液浓度的自然对数值（Inc）建立标准曲线。
9.4　同批次试纸条只需建立一次标准曲线，将建立好的标准曲线与项目信息存储于 ID 卡中，便于样品随时随地检测。

10　检测过程

10.1　将干式恒温孵育器（6.5）开机，设置温度 37℃，待温度升至 37℃后方可使用。
10.2　时间分辨荧光免疫定量分析仪（6.6）预热 5 min 后，插入试纸条所对应的 ID 卡（5.15）。

10.3 从铝箔袋中取出脱氧雪腐镰刀菌烯醇荧光免疫定量检测试纸条（5.16），水平放置于干式恒温孵育器（6.5）。

10.4 用移液器（6.4）吸取 100 μL 经过前处理的待测样品（8.2）加入试纸条的加样孔中，盖上孵育器盖开始计时孵育 6 min。

10.5 孵育结束后将试纸条（5.16）插入荧光免疫定量分析仪（6.6）的试纸条插槽中，点击读数。

11 结果计算

样品中脱氧雪腐镰刀菌烯醇含量以质量分数 X 计，数值以微克每千克（μg/kg）表示。仪器按如下公式自动计算。

$$X = \frac{P \times V \times n \times 1000}{m \times 1000} \quad \cdots\cdots (1)$$

式中：

P—从标准曲线上查得的待测液中脱氧雪腐镰刀菌烯醇含量的数值，单位为纳克每毫升（ng/mL）；

V—样品待测液体积的数值，单位为毫升（mL）；

n—样品稀释倍数；

m—样品质量的数值，单位为克（g）。

计算结果保留至小数点后两位。

12 方法性能

方法的检出限为 25 μg/kg，定量限为 100 μg/kg，检测线性范围为 100 μg/kg～10000 μg/kg。重复性条件下获得的两次独立测定结果的绝对差值不超过算术平均值的 20%。