

《冷鲜牛羊肉中鸭源性成分快速检测方法 胶体金免疫层析法》

方法编制说明

2023 年 8 月

目 录

一、目的意义.....	1
二、编制工作简况.....	1
1.任务来源.....	1
2.编写经过.....	1
三、编写的原则.....	2
四、主要技术内容说明.....	2
1.兔抗鸭 IgY 抗体的效价.....	2
2.胶体金标记抗体的质量鉴定.....	2
3.胶体金标记抗体的特异性与敏感性测定.....	4
4.样品提取条件的确定.....	4
5.方法检出限.....	4
6.重复性试验.....	4
7.特异性实验.....	5
8.结论.....	6
五、标准体系中的位置，与现行相关法律、法规、规章及相关标准，特别是强制性标准的协调性.....	6
六、重大分歧意见的处理经过和依据.....	6
七、标准性质的建议和说明.....	6
八、贯彻标准的要求和措施建议.....	6
九、废止现行相关标准的建议.....	6
十、其它应予说明的事项.....	6

一、目的意义

本项目针对鸭源性成分快速检测方法的缺少问题，拟采用胶体金免疫层析技术建立操作性强、简便易行、快速准确的冷鲜牛羊肉中鸭源性成分的胶体金免疫层析快速检测的团体标准。

近年来，随着社会的发展和经济水平不断提高，人们的饮食结构发生了很大的改变，肉制品成为广大消费者餐桌上的主角。随着肉制品的需求量增加，一些不法商贩就产生了掺假想法：把价格低廉的鸭肉掺杂在牛羊肉等高价肉制品中，谋取暴利。不仅损害消费者的利益，扰乱正常的市场秩序，造成恶劣的社会影响。因此，建立快速、准确的肉类鉴定检测方法尤为重要。

目前，对于肉源性成分鉴定检测，采用的技术有：核酸检测 PCR 技术、红外光谱技术、蛋白质谱技术、特异性蛋白的免疫学技术等。其中 PCR 检测方法和酶联免疫法是目前使用比较广泛、操作比较成熟的检测方法。但是二者需要配备昂贵的仪器设备，专业的实验人员，检测方法对环境和操作者要求较高，检测成本也比较高，仅在实验室内操作，无法满足现场快速检测的要求。本研究拟采用胶体金免疫层析技术，将检测试纸带到检测鉴定现场操作，可以满足现场快速检测的要求，为市场监管人员提供有力的技术支撑，具有重要意义。

二、编制工作简况

1.任务来源

国家市场监督管理总局技术创新中心（农产品安全快速检测与追溯）筹建计划项目。

2.编写经过

（1）2021 年根据国家市场监督管理总局技术创新中心（农产品安全快速检测与追溯）筹建计划，课题组对现有相关研究成果进行论证，成立标准起草小组。

（2）标准起草小组分别于 2023 年 4 月 20 日、7 月 17 日召开两次小组会，形成标准初稿。为确定方法的分析步骤及方法各项技术参数的评价，在本单位和相关协作实验室进行了大量的方法研究、验证和数据统计，在广泛的调查研究和必要的试验验证的工作基础上，根据 GB/T 1.1《标准化工作导则第一部分：标准的结构和编写规则》及 GB/T 20001.4《标准编写规则第 4 部分：化学分析方法》所规定的内容和格式编写

完成了《冷鲜牛羊肉中鸭源性成分快速检测方法 胶体金免疫层析法》方法草案。

三、编写的原则

本标准按GB/T1.1-2020《标准化工作导则 第1部分：标准的结构和编写规则》和GB/T 20001.4-2015《标准编写规则 第4部分：试验方法标准》的规定编写。编制原则是参考国内外其他行业最新的检测方法，同时考虑现有检测机构的检测能力和实际情况来制定完成的，以确保标准的科学性、先进性、可行性和操作性。

四、主要技术内容说明

1.兔抗鸭 IgY 抗体的效价

效价优良的抗 IgY 抗体是建立检测方法的基础。利用酶联免疫吸附试验(ELISA)检测兔抗鸭 IgY 抗体的效价。结果显示，兔抗鸭 IgY 多克隆抗体效价高于 1:12500000 (图 1)。表明抗体的效价较高，满足进一步用于检测的要求。

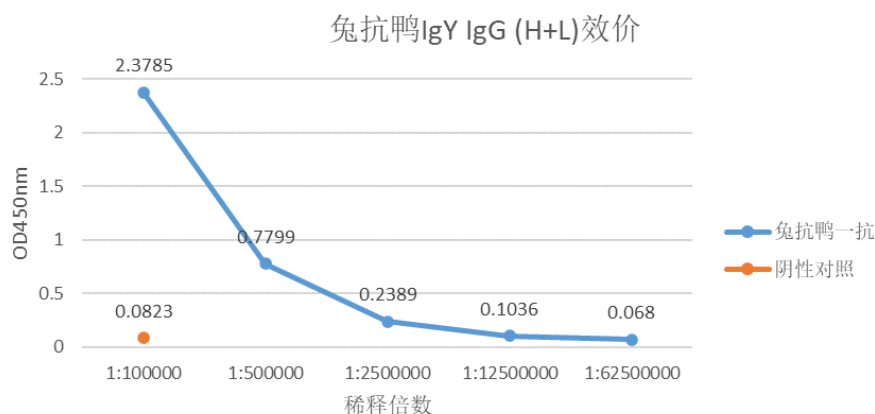


图 1 兔抗鸭 IgY 多克隆抗体的效价检测

2. 胶体金标记抗体的质量鉴定

(1) 胶体金颗粒直径测定：

胶体金的粒径尺寸与均匀程度对抗体蛋白吸附和检测结果有着较大影响。首先通过激光粒度仪 (Mastersizer 2000) 对胶体金抗体溶液进行直径分布鉴定，结果见图 2。由于胶体金抗体稀释液中含有牛血清白蛋白 (BSA)，为了排除对胶体金测试结果的干扰，我们首先分析了 BSA 溶液的颗粒直径，发现其直径测得为 10nm 以下(图 2A)。接下来我们分析了胶体金标记的抗体溶液中的直径分布。结果表明其中 AU-兔抗鸭抗

体（图 2B）中除了直径较小的 BSA 颗粒外，其胶体金的直径平均为 40 nm 左右，并且主峰宽度较小，表明制备的胶体金颗粒均匀，符合使用要求。

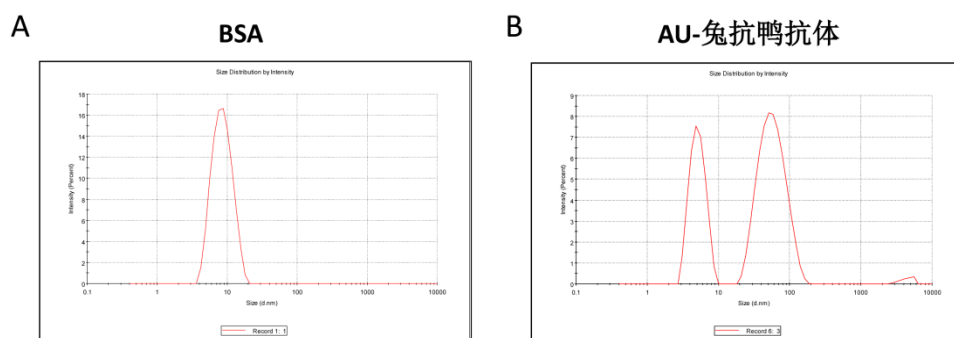


图 2. 胶体金抗体溶液激光粒度仪检测结果

(2) 胶体金抗体溶液的紫外可见吸收光谱测量：

根据胶体金粒径与其紫外可见光区吸收光谱的最大吸收波长之间的关系，直径为 20~40 nm 的胶体金颗粒在波长 520nm 左右出现最大吸收值峰 (λ_{max})。用 0.02 Mol/L PBS 液（含 1%BSA）将胶体金抗体稀释，加入 96 孔酶标板，每孔 100uL，每个样品 3 个复孔，利用酶标仪在 400~700 nm 波长范围内进行扫描 AU-兔抗鸭抗体溶液的最大吸收峰峰值均为 520nm，表明其胶体金平均直径均为 20~40 nm 左右。以上结果与激光粒度仪测得的直径分布基本类似，进一步说明 AU-兔抗鸭抗体符合预期要求。

3. 胶体金标记抗体的特异性与敏感性测定

斑点金免疫渗滤测定法（dot immuno gold filtration assay, DIGFA）是一种高度灵敏和特异的抗体特异性检测方法。将蛋白质抗原（鸭 IgY）直接点样在硝酸纤维膜上，在硝酸纤维膜下垫有吸水性强的垫料，即为渗滤装置。再滴加胶体金标记的抗体，结果在抗原抗体反应处发生金颗粒聚集，阳性结果在膜上呈红色斑点，阴性反应不着色或颜色较浅。本实验结果如图 3 所示。结果表明，AU-兔抗鸭抗体未与阴性对照 BSA 发生结合。其次，AU-兔抗鸭抗体能与鸭 IgY 特异性结合，但是不与抗原发生非特异的交叉反应。因此，以上结果表明 AU-兔抗鸭抗体能够与相应抗原发生结合，其特异性与敏感性较好，能够用于下一步的测试。

兔抗鸭抗体



BSA对照

鸭IgY

图 3. 斑点金免疫渗滤测定实验分析抗体的特异性与敏感性

4. 样品提取条件的确定

分别对羊肉和牛肉进行加标实验,对比了两种提取缓冲液:方法1为: 0.01 M PBS (PH7.2~7.4), 加入Triton X-100 (终浓度为0.1%), 充分混匀后置于4℃备用。使用前按1:100的体积比向其中加入蛋白酶抑制剂; 方法2为: 0.02M PBS (pH 7.2 ~ 7.4)。实验表明, 方法2的提取缓冲液操作简单, 有较好的回收率, 更为适合冷鲜牛羊肉中鸭源性成分快速测定。

5. 方法检出限

本文采用的添加法,是在对照空白样品中加入一定量鸭肉,通过检测具有数理统计意义后定为方法的检出限,经实验,鸭源性最低检出限可达 5% (质量分数)。

样品编号	鸭源性含量 5% (羊肉基质) (T/C 值)	鸭源性含量 5% (牛肉基质) (T/C 值)
1	0.77	0.79
2	0.75	0.72
3	0.78	0.76
4	0.79	0.76
5	0.75	0.72

表 1 鸭源性成分的胶体金免疫层析检测试纸的检测限测定结果

6. 重复性试验

分别制备牛肉、羊肉基质掺杂鸭肉浓度 5% 的样本各 50 份,用试纸进行检测,通过仪器读取 T/C 值,计算变异系数。

样品编号	鸭源性含量 5% (羊肉基质) (T/C 值)	鸭源性含量 5% (牛肉基质) (T/C 值)
1	0.77	0.79
2	0.75	0.72
3	0.78	0.76
4	0.79	0.76
5	0.75	0.72
6	0.70	0.71
7	0.73	0.78
8	0.69	0.66
9	0.79	0.65
10	0.65	0.77
11	0.77	0.65
12	0.71	0.77
13	0.77	0.72
14	0.65	0.70
15	0.77	0.71
16	0.66	0.78
17	0.76	0.77
18	0.74	0.71
19	0.78	0.77
20	0.71	0.75
21	0.78	0.75
22	0.71	0.76
23	0.70	0.74
24	0.71	0.66
25	0.75	0.72
26	0.76	0.70
27	0.74	0.65
28	0.78	0.77
29	0.77	0.79
30	0.73	0.65
31	0.75	0.77
32	0.78	0.78
33	0.77	0.76
34	0.73	0.70
35	0.75	0.74
36	0.75	0.66
37	0.72	0.72
38	0.70	0.78
39	0.63	0.75
40	0.71	0.75
41	0.70	0.76

表 2 重复性试验结果

7 特异性实验

随机抽取鸡肉、羊肉、牛肉、猪肉和鳕鱼肉样本，用试纸进行检测，考察其他动物组织对试纸条的影响。结果表明满足特异性要求。

样品编号	鸡肉	羊肉	牛肉	猪肉	鳕鱼肉
1	1.12	1.02	1.20	1.05	1.03

2	1.09	1.04	1.21	1.17	1.24
3	1.20	1.09	1.06	1.28	1.15

表 3 其他动物组织测定的 T/C 值

8.结论

本标准建立了冷鲜牛羊肉中鸭源性成分的胶体金免疫层析快速检测方法,方法检出限 (LOD): 5% (质量分数), 灵敏度: $\geq 99\%$, 特异性: $\geq 95\%$, 假阴性率: $\leq 1\%$, 假阳性率: $\leq 5\%$, 可以在 20min 内完成冷鲜牛羊肉中鸭源性成分快速检测。

目前我国尚无冷鲜牛羊肉中鸭源性成分的胶体金免疫层析的检测技术标准,本标准的建立,能够满足冷鲜牛羊肉中鸭源性成分快速的检验需求。能够填补动物源性成分快速检测方法的空白,为进行肉制品掺假监管、保障食品安全提供技术支持。

五、标准体系中的位置,与现行相关法律、法规、规章及相关标准,特别是强制性标准的协调性

本标准技术指标符合我国现行相关法律、法规、规章及相关标准要求。

六、重大分歧意见的处理经过和依据

本标准在编写过程和审定过程中未出现重大分歧意见。

七、标准性质的建议和说明

建议本标准以团体标准的形式发布和试运行,经过1年的试用后推荐为相关行业标准。

八、贯彻标准的要求和措施建议

建议本标准发布后立即实施。大连市分析测试学会组织该项标准的宣贯工作。

九、废止现行相关标准的建议

该标准属首次起草,无现行相关标准废止。

十、其它应予说明的事项

暂无。