

# 中华人民共和国国家标准

## 小麦中 T-2 毒素的酶联免疫吸附 测定方法 (ELISA)

GB/T 14933-94

Method for determination of T-2 toxin in wheat  
with enzyme-linked immunosorbent assay (ELISA)

### 1 主题内容与适用范围

本标准规定了谷物中 T-2 毒素的酶联免疫吸附测定方法 (ELISA)。

本标准适用于小麦及其制品中 T-2 毒素的测定。

本方法的最低检出量为 1  $\mu\text{g}/\text{kg}$ 。

### 第一篇 间接法

### 2 原理

将已知抗原吸附在固相载体表面,洗除未吸附抗原,加入一定量抗体与待测样品(含有抗原)提取液的混合液,竞争温育后,在固相载体表面形成抗原-抗体复合物。洗除多余抗体成分,然后加入酶标记的抗球蛋白的第二抗体结合物,与吸附在固体表面的抗原-抗体复合物相结合,再加入酶的底物。在酶的催化作用下,底物发生降解反应,产生有色产物,通过酶标检测仪,测出酶底物的降解量,从而推知被测样品中的抗原量。

### 3 试剂

本标准所用试剂,凡未指明规格者,均为分析纯,水为蒸馏水或用等纯度的水。

3.1 甲醇。

3.2 石油醚。

3.3 三氯甲烷。

3.4 无水乙醇。

3.5 乙酸乙酯。

3.6 二甲基甲酰胺。

3.7 四甲基联苯胺(TMB)。

3.8 吐温-20。

3.9 30%过氧化氢(30% $\text{H}_2\text{O}_2$ )。

3.10 抗体:杂交瘤细胞系 1D7 产生的抗 T-2 毒素的特异性单克隆抗体。

3.11 抗原:T-2 毒素与载体蛋白-牛血清白蛋白(BSA)的结合物。

3.12 兔抗鼠免疫球蛋白与辣根过氧化酶的结合物(酶标二抗)。

3.13 ELISA 缓冲液系统

3.13.1 包被缓冲液为 pH9.6 的碳酸盐缓冲液,称取 1.59 g 碳酸钠( $\text{Na}_2\text{CO}_3$ ),2.93 g 碳酸氢钠

中华人民共和国卫生部 1994-01-24 批准

1994-08-01 实施



(NaHCO<sub>3</sub>),加水稀释至 1 000 mL。

3.13.2 洗液为含 0.05%吐温-20 的 pH7.4 的磷酸盐缓冲液(简称为 PBS-T)配制方法为:

称取磷酸二氢钾(KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>)0.2 g,磷酸氢二钠(Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub>·12H<sub>2</sub>O)2.9 g,氯化钠(NaCl)8.0 g,氯化钾(KCl)0.2 g,吐温-20 0.5 mL,加水至 1 000 mL。

3.13.3 底物缓冲液为 pH5.0 的磷酸-柠檬酸缓冲液,配制方法为:

0.1 mol/L 柠檬酸(C<sub>6</sub>H<sub>8</sub>O<sub>7</sub>·H<sub>2</sub>O),即称取柠檬酸 19.2 g,加水至 1 000 mL,为甲液;

0.2 mol/L 磷酸氢二钠(Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub>),即称取磷酸氢二钠 71.7 g,加水至 1 000 mL,为乙液;

取甲液 24.3 mL,乙液 25.7 mL,加水至 100 mL,即可。

3.13.4 底物溶液:取 50 μL TMB(10 mg TMB 溶于 1 mL 二甲基甲酰胺中)溶液+10 mL 底物缓冲液+10 μL 30%过氧化氢,混均。

3.14 T-2 毒素标准溶液

用甲醇配成 1 mg/mL T-2 毒素贮备液,-20℃冰箱贮存。于检测当天,精密吸取贮备液,用 20%甲醇的 PBS(配制方法同 PBS-T,不加吐温-20 即可)稀释成制备标准曲线的所需浓度。

## 4 仪器

所有玻璃器皿均用硫酸洗液浸泡,用自来水、蒸馏水冲洗。

4.1 酶标检测仪。

4.2 酶标板(40 孔或 96 孔)。

4.3 电动振荡器。

4.4 电热恒温水浴锅。

4.5 具 0.2 mL 尾管的 10 mL 小浓缩瓶。

## 5 分析步骤

### 5.1 提取

称取 20 g 粉碎并通过 20 目筛的样品,置 200 mL 具塞锥形烧瓶中,加 8 mL 水和 100 mL 三氯甲烷-无水乙醇(4:1),密塞,振荡 1 h,通过滤纸过滤,取 25 mL 滤液于蒸发皿中,置 90℃水浴上通风挥干。用 50 mL 石油醚分次溶解蒸发皿中残渣,洗入 250 mL 分液漏斗中,再用 20 mL 甲醇-水(4:1)分次洗涤,转入同一分液漏斗中,振摇 1.5 min,静置约 15 min,收下层甲醇-水提取液过层析柱净化(层析柱的装备:在层析柱下端与小管相联结处塞约 0.1 g 脱脂棉,尽量塞紧,先装入 0.5 g 中性氧化铝,敲平表面,再加入 0.4 g 活性炭,敲紧)。

将过柱后的洗脱液倒入蒸发皿中,并于水浴锅上浓缩至干,趁热加 3 mL 乙酸乙酯,加热至沸,挥干,再重复一次,最后加 3 mL 乙酸乙酯,冷至室温后转入浓缩瓶中。用适量乙酸乙酯洗涤蒸发皿,并入浓缩瓶中。将浓缩瓶置 95℃水浴锅上,挥干冷却后,用含 20%甲醇的 PBS 定容,供 ELISA 检测之用。

### 5.2 ELISA 检测

5.2.1 用 T-2-BSA(4 μg/mL)包被酶标板,每孔 100 μL,4℃过夜;

5.2.2 酶标板用 PBS-T 洗 3 次,每次 3 min 后,加入不同浓度的 T-2 标准溶液(制作标准曲线)或样品提取液(检测样品中的毒素含量)与抗体溶液的混合液(1:1,每孔 100 μL,该混合液应于使用的前一天配好,4℃过夜备用),置 37℃ 1 h;

5.2.3 酶标板洗 3 次,每次 3 min 后,加入酶标二抗,每孔 100 μL,37℃ 1.5 h;

5.2.4 同上述洗涤后,加入底物溶液,每孔 100 μL,37℃ 30 min;

5.2.5 用 1 mol/L 硫酸溶液终止反应,每孔 50 μL,于 450 nm 处测定吸光度值。

## 6 计算

$$\text{T-2 浓度(ng/g)} = C \times V_1/V_2 \times D \times 1/M$$



式中： $C$ ——酶标板上所测得的 T-2 毒素的量(ng)，根据标准曲线求得；

$V_1$ ——样品提取液的体积 mL；

$V_2$ ——滴加样液的体积，mL；

$D$ ——样液的总稀释倍数；

$M$ ——样品质量，g。

## 7 精密度

本法的精密度为 6.8~20.3，平行允许差为 4.7%~19.2%。

## 第二篇 直接法

## 8 原理

将已知抗原吸附在固相载体表面，洗除未吸附的抗原，加入一定量的酶标记抗体与样品(含有抗原)提取液的混合液，竞争温育后，在固相载体表面形成抗原-抗体-酶复合物。洗除多余部分，加入酶的底物。在酶的催化作用下，底物发生降解反应，产生有色物质。通过酶标检测仪，测出酶底物的降解量，从而推知被测样品中的抗原量。

## 9 试剂

本标准所用试剂，凡未指明规格者，均为分析纯，水为蒸馏水或同等纯度的水。

9.1 甲醇。

9.2 石油醚。

9.3 三氯甲烷。

9.4 无水乙醇。

9.5 乙酸乙酯。

9.6 二甲基甲酰胺。

9.7 四甲基联苯胺(TMB)。

9.8 吐温-20。

9.9 30%过氧化氢(30% $H_2O_2$ )。

9.10 抗 T-2 毒素单克隆抗体与辣根过氧化酶结合物。

9.11 抗原：T-2 毒素与载体蛋白-牛血清白蛋白的结合物(T-2-BSA)。

9.12 ELISA 缓冲液系统

9.12.1 包被缓冲液为 pH9.6 的碳酸盐缓冲液，称取 1.59 g 碳酸钠( $Na_2CO_3$ )，2.93 g 碳酸氢钠( $NaHCO_3$ )，加水稀释至 1000 mL。

9.12.2 洗液为含 0.05%吐温-20 的 pH7.4 的磷酸盐缓冲液(简称为 PBS-T)配制方法为：

称取磷酸二氢钾( $KH_2PO_4$ )0.2 g，磷酸氢二钠( $Na_2HPO_4 \cdot 12H_2O$ )2.9 g，氯化钠( $NaCl$ )8.0 g，氯化钾( $KCl$ )0.2 g，吐温-20 0.5 mL，加水至 1000 mL。

9.12.3 底物缓冲液为 pH5.0 的磷酸-柠檬酸缓冲液，配制方法为：

0.1 mol/L 柠檬酸( $C_6H_8O_7 \cdot H_2O$ )，即称取柠檬酸 19.2 g，加水至 1000 mL，为甲液；

0.2 mol/L 磷酸氢二钠( $Na_2HPO_4$ )，即称取磷酸氢二钠 71.7 g，加水至 1000 mL，为乙液；

取甲液 24.3 mL，乙液 25.7 mL，加水至 100 mL，即可。

9.12.4 底物溶液：取 50  $\mu$ L TMB(10 mg TMB 溶于 1 mL 二甲基甲酰胺中)溶液+10 mL 底物缓冲液+10  $\mu$ L30%过氧化氢，混均。

9.13 T-2 毒素标准溶液



用甲醇配成 1 mg/mL T-2 毒素贮备液, -20℃ 冰箱贮存。于检测当天, 精密吸取贮备液, 用 20% 甲醇的 PBS (配制方法同 PBS-T, 不加吐温-20 即可) 稀释成制备标准曲线的所需浓度。

## 10 仪器

所有玻璃器皿均用硫酸洗液浸泡, 用自来水、蒸馏水冲洗。

- 10.1 酶标检测仪。
- 10.2 酶标板(40 孔或 96 孔)。
- 10.3 电动振荡器。
- 10.4 电热恒温水浴锅。
- 10.5 具 0.2 mL 尾管的 10 mL 小浓缩瓶。

## 11 分析步骤

### 11.1 提取

称取 20 g 粉碎并通过 20 目筛的样品, 置 200 mL 具塞锥形烧瓶中, 加 8 mL 水和 100 mL 三氯甲烷-无水乙醇(4:1), 密塞, 振荡 1 h, 通过滤纸过滤, 取 25 mL 滤液于蒸发皿中, 置 90℃ 水浴上通风挥干。用 50 mL 石油醚分次溶解蒸发皿中残渣, 洗入 250 mL 分液漏斗中, 再用 20 mL 甲醇-水(4:1) 分次洗涤, 转入同一分液漏斗中, 振摇 1.5 min, 静置约 15 min, 收下层甲醇-水提取液过层析柱净化(层析柱的装备: 在层析柱下端与小管相联结处塞约 0.1 g 脱脂棉, 尽量塞紧, 先装入 0.5 g 中性氧化铝, 敲平表面, 再加入 0.4 g 活性炭, 敲紧)。

将过柱后的洗脱液倒入蒸发皿中, 并于水浴锅上浓缩至干, 趁热加 3 mL 乙酸乙酯, 加热至沸, 挥干, 再重复一次, 最后加 3 mL 乙酸乙酯, 冷至室温后转入浓缩瓶中。用适量乙酸乙酯洗涤蒸发皿, 并入浓缩瓶中。将浓缩瓶置 95℃ 水浴锅上, 挥干冷却后, 用含 20% 甲醇的 PBS 定容, 供 ELISA 检测之用。

### 11.2 ELISA 检测

- 11.2.1 用 T-2-BSA(4 μg/mL) 包被酶标板, 每孔 100 μL, 4℃ 过夜。
- 11.2.2 酶标板用 PBS-T 洗 3 次, 每次 3 min 后, 加入不同浓度的 T-2 标准溶液(制作标准曲线)或样品提取液(检测样品毒素含量)与抗体-酶结合物溶液(1:100)的混合液(1:1, 每孔 100 μL, 该混合液应于使用的前一天配好, 4℃ 过夜备用), 置 37℃ 1.5 h。
- 11.2.3 酶标板洗 3 次, 每次 3 min 后, 加入底物溶液。每孔 100 μL, 37℃ 30 min。
- 11.2.4 用 1 mol/L 硫酸溶液终止反应, 每孔 50 μL, 于 450 nm 处测定吸光度值。

## 12 计算

$$\text{T-2 浓度(ng/g)} = C \times V_1 / V_2 \times D \times 1/m$$

式中:  $C$ ——酶标板上所测得的 T-2 毒素的量(ng), 根据标准曲线求得;

$V_1$ ——样品提取液的体积, mL;

$V_2$ ——滴加样液的体积, mL;

$D$ ——样液的总稀释倍数;

$m$ ——样品质量, g。

## 13 精密度

本法的精密度为 5.3~15.4, 平行允许差为 5.7%~14.2%。



附加说明:

本标准由卫生部卫生监督司提出。

本标准由卫生部食品卫生监督检验所负责起草。

本标准主要起草人阳传和、罗雪云、计融。

本标准由卫生部委托技术归口单位卫生部食品卫生监督检验所负责解释。