**农业行业标准**

**《蜂王浆中蜂王浆主蛋白4的测定 酶联免疫吸附法》**

**（征求意见稿）**

**编制说明**

中国农业科学院蜜蜂研究所

二零二三年五月

# 一、工作简况

## （一）任务来源

根据农业农村部农财发[2019]77号文件《农业农村部关于下达2019年农业行业标准制定和修订项目资金的通知》，中国农业科学院蜜蜂研究所承担了标准《蜂王浆中蜂王浆主蛋白4的测定酶联免疫吸附法》的制定工作（项目计划编号：农财发[2019]77号2019026）。在完成标准的全部研究工作后，研究单位依据中华人民共和国农业农村部“十三五”全国农产品质量安全提升规划中相关规定，以及全部实验结果、方法验证结果起草了本检测方法文本和编制说明。

## （二）制定背景

### 1. 意义

蜂王浆是一种具有滋补保健和延年益寿功能的天然功能性蜂产品。蜂王浆不易保存，极易变质，因而，蜂王浆的品质和其新鲜度紧密相关。现行的蜂王浆国标（GB/T 9697-2008）和国际标准（ISO 12824:2016）对蜂王浆的评价和质控具有指导性意义，但缺乏真实反映蜂王浆新鲜度的指标和检测方法，这也是现行蜂王浆质量标准的一个缺陷，并对产业可持续发展留下一定隐患。中国是世界蜂王浆第一生产国和第一出口国，因此，探求和建立蜂王浆新鲜度评价方法势在必行。

蜂王浆是蜜蜂哺育蜂咽下腺和上颚腺的分泌物，是一种极其不稳定的天然产物，对储藏条件要求较高。研究表明，在室温下储藏1周，蜂王浆中蛋白质就有明显降解，储藏1个月就会发生质变。随储藏时间的增长，蜂王浆颜色加深，黏度增大，产生气泡；水溶性蛋白和单糖含量降低，可滴定酸增加，维生素C含量降低，SOD酶活力下降，抑菌性下降。因此，蜂王浆的储藏和保鲜一般在隔氧避光条件下进行低温冷冻保藏。若储藏不当，其各种性状(物理或化学)及其品质就会发生显著变化，蜂王浆的各种活性成分损失，其保健功能就会大幅降低，甚至丧失。

不饱和脂肪酸10-羟基-2-癸烯酸(10-HDA)又称王浆酸，是自然界中，仅在蜂王浆中存在的一种特殊生物活性物质。蜂王浆国标和国际标准都对蜂王浆中10-HDA的含量进行了规定，但由于10-HDA即使在高温下也不会大量分解，因此，10-HDA并不适合作为蜂王浆新鲜度的评价指标，但作为蜂王浆真假的判断标准，其含量能在一定程度上反映蜂王浆的质量。

我们采用高分辨质谱和生化检测方法对蜂王浆中的所有蛋白质进行了一个随贮存温度和时间的监测，发现蜂王浆中可溶性蛋白质随贮存温度的升高和时间的加长都有很大程度的降解。王浆主蛋白家族（Major Royal Jelly Proteins，MRJPs）是蜂王浆中最主要的一类蛋白质，其含量占蜂王浆可溶性蛋白质含量的80%以上。其中，MRJP1、MRJP2、MRJP3、MRJP4和MRJP5约占MRJPs总量的82%～90%，其含量直接影响蜂王浆的功能。在这5种蛋白质中，蜂王浆主蛋白3-5由于含量相对较低，变化差异大，表现对温度敏感，在室温和4 ℃存放随时间延长而逐渐降解。其中，蜂王浆主蛋白4对温度更加敏感，在36℃条件下存放3天，MRJP4就已经完全降解而检测不到。同时，通过我们的蜂王浆抑菌实验发现，36℃存放3天后，蜂王浆水溶液对大肠杆菌、金黄色葡萄球菌、枯草芽孢杆菌和幼虫芽孢杆菌的抑制作用显著降低，MRJP4的含量与这蜂王浆的抑菌效果趋势完全一致。因此，我们认为MRJP4可真实反映蜂王浆新鲜度，是蜂王浆品质的标志，应纳入优质蜂王浆质量指标。

蜂王浆冻干粉通过真空冷冻干燥方法加工制成的脱水蜂王浆粉末，一般是3公斤的鲜蜂王浆做1公斤的蜂王浆冻干粉。蜂王浆冻干粉相比于鲜纯蜂王浆更易储存，可长期冷藏保存。但与新鲜蜂王浆一样，蜂王浆冻干粉也存在贮存和功效的问题。新鲜蜂王浆制备的蜂王浆冻干粉，以及贮存条件较好的蜂王浆冻干粉其营养价值更高，功效更好。因此，蜂王浆中MRJP4的含量也可反映其质量。

研究通过抗原抗体反应，筛选出特异性好灵敏度高的抗体对，建立MRJP4酶联免疫吸附（ELISA）检测方法，能够实现对蜂王浆和蜂王浆冻干粉中MRJP4的定量。这将为完善蜂王浆质量标准，有效监控蜂王浆新鲜度，进一步规范蜂王浆市场奠定基础。

### 2. 国内外研究概况

蜂王浆主蛋白作为评价蜂王浆新鲜度的标准并非我们第一次提出。日本科学家Kamakura 等人在2001年就提出，随着温度升高和储存时间的延长，蜂王浆中MRJPs的含量也显著降低，其中一种57 kD的蛋白可作为评价蜂王浆新鲜度的指标[1]。我国也有研究者针对MRJP1建立了ELISA检测方法，预通过准确定量MRJP1浓度来评价蜂王浆新鲜度[2]。但MRJP1含量在蜂王浆最高，其含量变化无法准确检测，因此在实际应用上不适合作为检测指标。中国农业科学院蜜蜂蛋白质组创新团队采用检测灵敏度较高的双相电泳和飞行时间质谱联用的方法发现，在4℃和-20℃的存放条件下，储存一年后， MRJP3、MRJP4和MRJP5已经检测不到，建议采用MRJP5作为评价蜂王浆新鲜度的标准[3-4]。

我们进一步对蜂王浆中的可溶性蛋白质进行了一个随贮存温度和时间的监测，发现蜂王浆中可溶性蛋白质随贮存温度的升高和时间的加长都有很大程度的降解。其中，葡萄糖氧化酶、葡糖苷酶、葡糖脱氢酶这几种酶的含量极低，且在蜂王浆样品中极不稳定，无法实现准确检测。在MRJP1-5中，MRJP1和MRJP2含量最高，但表现对温度不敏感，在室温和4℃存放4周降解不明显，甚至在36℃能够稳定存在1周。MRJP3-5对温度非常敏感，在室温和4℃存放随时间延长而逐渐降解，在室温存放2周开始，3种蛋白含量开始显著降低；MRJP4在这3中蛋白中含量最低，对高温也更加敏感，在36℃条件下存放3天，MRJP4就已经完全降解而检测不到（图1）。因此，我们挑选了MRJP4作为蜂王浆新鲜度检测的标记物。

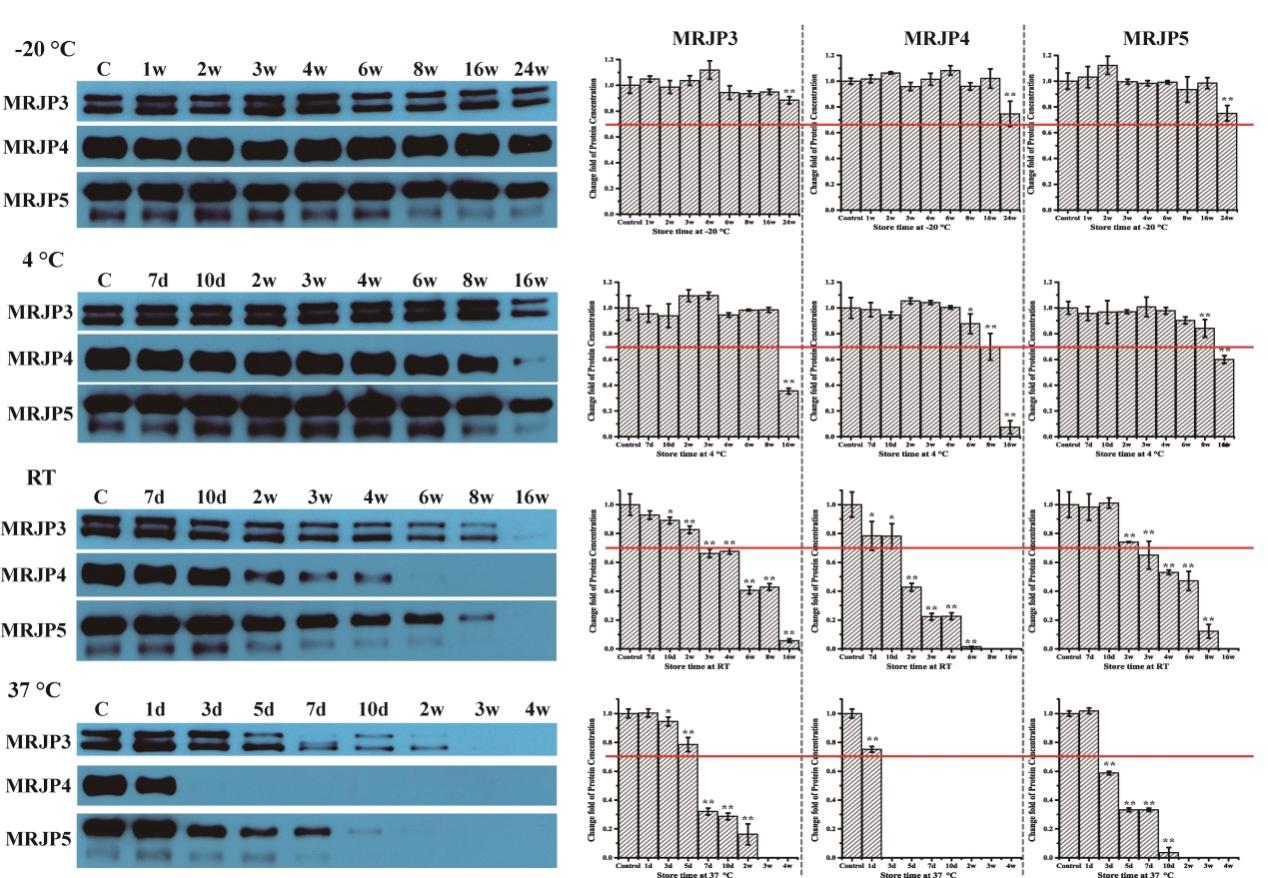


图1 蜂王浆主蛋白3-5在不同贮存条件蜂王浆中的含量测定

双夹心ELISA法是通过一对特异性的抗体，捕获抗原形成酶标抗体-抗原-固相抗体复合物，通过底物显色判断抗原含量。由于采用了特异性抗体对，大大减少了假阳性反应，在进行同源性较高蛋白家族中某一种蛋白的定量时更加准确。双夹心ELISA试剂盒体系稳定、准确性高，在实际检测中应用非常广泛 [5-6]，也被应用于国家和地方检测标准。因此，我们针对MRJP4蛋白，制备了一对特异性鼠单克隆抗体对，研发制作成了双夹心ELISA试剂盒，对MRJP4进行准确定量。

## （三）起草主要工作过程

根据国家有关标准制定和修订工作的要求，在标准的起草编制过程中，主要做了以下几个方面的工作：

### 前期准备

2019年2月，项目研制团队召开第一次工作会议，制定技术实施方案，确定项目总体框架，分配相关人员负责相应工作；项目研制团队成立标准编制小组，对国际、国内相关标准情况和文献进行了查询和研究，对蜂王浆中蜂王浆珠蛋白4的测定方法进行了广泛调研，形成方案初稿。期间收集相关文献如下：

1. Kamakura M, Fukuda T, Fukushima M, Yonekura M: **Storage-dependent degradation of 57-kDa protein in royal jelly: a possible marker for freshness**. *Bioscience, biotechnology, and biochemistry* 2001, **65**(2):277-284.

2. Shen LR, Wang YR, Zhai L, Zhou WX, Tan LL, Li ML, Liu DD, Xiao F: **Determination of royal jelly freshness by ELISA with a highly specific anti-apalbumin 1, major royal jelly protein 1 antibody**. *J Zhejiang Univ Sci B* 2015, **16**(2):155-166.

3. Li JK, Feng M, Zhang L, Zhang ZH, Pan YH: **Proteomics analysis of major royal jelly protein changes under different storage conditions**. *Journal of proteome research* 2008, **7**(8):3339-3353.

4. Li JK, Wang T, Peng WJ: **Comparative analysis of the effects of different storage conditions on major royal jelly proteins**. *Journal of Apicultural Research* 2007, **46**(2):73-80.

5. 刘春霞, 辛颜彬, 杨雪芬等. **双抗体夹心ELISA 检测生殖支原体抗原方法的初步建立及临床应用**.*军事医学科学院院刊*, 2002, 26 (2):127-129.

6. 邱广民, 谢庆梅. **ELISA双抗原夹心法在血液检测中的应用**. *临床输血与检验*, 2003, 5(4): 268-269.

7. Ciulu M, Floris I, Nurchi VM, Panzanelli A, Pilo MI, Spano N, Sanna G: **A Possible Freshness Marker for Royal Jelly: Formation of 5-Hydroxymethyl-2-furaldehyde as a Function of Storage Temperature and Time**. *J Agric Food Chem* 2015, **63**(16):4190-4195.

8. Sabatini AG, Marcazzan GL, Caboni MF, Bogdanov S, de Almeida-Muradian LB: **Quality and standardisation of Royal Jelly**. *Journal of ApiProduct and ApiMedical Science* 2009, **1**(1):1-6.

9. Kanelis D, Tananaki C, Liolios V, Dimou M, Goras G, Rodopoulou MA, Karazafiris E, Thrasyvoulou A: **A suggestion for royal jelly specifications**. *Arh Hig Rada Toksiko* 2015, **66**(4):275-284.

10. Messia MC, Caboni MF, Marconi E: **Storage stability assessment of freeze-dried royal jelly by furosine determination**. *J Agric Food Chem* 2005, **53**(11):4440-4443.

11. Marconi E, Caboni MF, Messia MC, Panfili G: **Furosine: a suitable marker for assessing the freshness of royal jelly**. *J Agric Food Chem* 2002, **50**(10):2825-2829.

12. Qiao J, Wang X, Liu L, Zhang H: **Nonenzymatic Browning and Protein Aggregation in Royal Jelly during Room-Temperature Storage**. *J Agric Food Chem* 2018, **66**(8):1881-1888.

13. 张娟, 曾志将: **不同贮存温度和时间对蜂王浆中游离氨基酸的影响**. *江西农业大学学报*2008, **30**(6):997-999.

14. 李利君, 孙亮先, 彭莺, 杨远帆, 倪辉: **蜂王浆对三种革兰氏阴性菌的抑菌特性**. *泉州师范学院学报*2008, **26**(2):96-99.

15. Kamakura M, Suenobu N, Fukushima M: **Fifty-seven-kDa protein in royal jelly enhances proliferation of primary cultured rat hepatocytes and increases albumin production in the absence of serum**. *Biochem Bioph Res Co* 2001, **282**(4):865-874.

16. Antinelli JF, Zeggane S, Davico R, Rognone C, Faucon JP, Lizzani L: **Evaluation of (E)-10-hydroxydec-2-enoic acid as a freshness parameter for royal jelly**. *Food chemistry* 2003, **80**(1):85-89.

### 制定标准实施方案

标准制定小组于2019年3月制定了详细的实施方案和技术路线，组建了标准起草小组、采样团队小组和方法验证团队。标准的主要起草单位为中国农业科学院蜜蜂研究所、辽宁省农业发展服务中心、[武汉市葆春蜂王浆有限责任公司](http://www.baidu.com/link?url=Fv3B8MIW-8eCug2C04hI5Zsi3ejNRz-_QTe0Va-YqovpUL0KqPJhblv8UgNY8Lpd" \t "_blank)和浙江花谷源蜂业有限公司。标准制定过程主要由中国农业科学院蜜蜂研究所人员完成基础研究、方法开发、样品验证等实验工作，与另外三家单位一起完成了资料的收集、样本的采集、文本撰写、市场调研和征求意见等工作。

表1. 主要起草人员信息及任务分工

|  |  |  |  |
| --- | --- | --- | --- |
| 姓名 | 单位 | 职称 | 专业特长  及分工 |
| XXXX | 中国农业科学院蜜蜂研究所 | 副研究员 | 组织和完成项目 |
| XXXX | 中国农业科学院蜜蜂研究所 | 副研究员 | 方法开发 |
| XXXX | 中国农业科学院蜜蜂研究所 | 副研究员 | 方法开发 |
| XXXX | 中国农业科学院蜜蜂研究所 | 助理研究员 | 方法开发、验证 |
| XXXX | 中国农业科学院蜜蜂研究所 | 助理研究员 | 方法开发、验证 |
| XXXX | 中国农业科学院蜜蜂研究所 | 研究员 | 项目组织 |
| XXXX | 中国农业科学院蜜蜂研究所 | 研究生 | 样品检测、资料整理 |
| XXXX | 中国农业科学院蜜蜂研究所 | 研究生 | 样品检测 |
| XXXX | 中国农业科学院蜜蜂研究所 | 研究生 | 资料整理 |
| XXXX | 辽宁省农业发展服务中心 | 高级畜牧师 | 市场调研、样品采集 |
| XXXX | [武汉市葆春蜂王浆有限责任公司](http://www.baidu.com/link?url=Fv3B8MIW-8eCug2C04hI5Zsi3ejNRz-_QTe0Va-YqovpUL0KqPJhblv8UgNY8Lpd" \t "_blank) | —— | 市场调研、样品采集 |
| XXXX | 浙江花谷源蜂业有限公司 | —— | 市场调研、样品采集 |

### 标准制定和研究

2019年4月至2020年6月，标准编制小组开展蜂王浆及蜂王浆冻干粉中蜂王浆主蛋白4测定方法的开发，确立方法准确度、精密度、加标回收率、并对实际样品进行检测与分析等，进行标准制定研究工作。2021年6-12月，由于本方法中没有已有标准品，根据专家建议，对制备的MRJP4参比品的纯度进行了自检和外送鉴定，并对本方法的检出限和定量限进行了实验确认。

### 起草标准定向征求意见稿

在制标单位完成MRJP4抗体的制备、ELISA试剂盒的开发、检测方法条件确定的研究工作后，由制标单位制定检测方法复核验证方案和提供实验材料，委托农业农村部奶及奶制品质量监督检验测试中心（北京）、农业农村部蔬菜品质质量监督检验测试中心（北京）、秦皇岛海关技术中心三家检测机构对标准草案的检测方法的特异性、检测灵敏度、检测极限、重复性、重现性进行复核验证实验。经过复核单位的独立、科学和严格的复核验证后，提供了三份复核验证报告（具体报告见本编制说明附件2）。

三家单位验证工作完成后，2019年9月至2020年2月，制标单位利用建成的蜂王浆主蛋白4检测方法完成超过160份实际蜂王浆样本和12份蜂王浆冻干粉样本进行检测，充分验证了检测体系的准确、稳定和可重复性，并按照《GB/T 1.1-2020标准化文件的结构和起草规则》和《GB/T 20001.4-2015标准编写规则》起草编写标准文本和编制说明定向征求意见稿。

### 定向征求意见

2020年10月，标准编制小组根据相关方面意见和实验室验证结果，对标准初稿进行了修改和完善，在此基础上，形成了《蜂王浆中蜂王浆主蛋白4的测定酶联免疫吸附法》标准征求意见稿。此次定向征求意见，向包括本单位在内的，大学、研究单位、检测机构和蜂产品企业再内的21个单位22位专家发出征求意见稿，最后回函22份（见表2）。经汇总，统计意见共147条，其中采纳123条，不采纳18条，部分采纳6条。

表2. 定向征求意见专家信息汇总表

|  |  |  |  |
| --- | --- | --- | --- |
| 序号 | 单位性质 | 单 位 | 专家姓名/职称 |
| 1 | 高 校 | 中国农业大学 | 王战辉 教授 |
| 2 | 江西农业大学 | 曾志将 教授 |
| 3 | 烟台大学 | 李彦伸 副教授 |
| 4 | 浙江大学 | 沈立荣 教授 |
| 5 | 山东农业大学 | 胥保华 教授 |
| 6 | 青岛农业大学 | 韩荣伟 副教授 |
| 7 | 北京工商大学 | 马爱进 教授 |
| 8 | 山西农业大学 | 张旭风 副教授 |
| 9 | 检测机构 | 秦皇岛海关技术中心 | 崔宗岩 高级工程师 |
| 10 | 农业农村部奶及奶制品质量监督检验测试中心（北京） | 郑 楠 研究员 |
| 11 | 农业农村部蔬菜品质监督检验测试中心（北京） | 许晓敏 高级工程师 |
| 12 | 青岛谱尼测试有限公司 | 阎玉林 工程师 |
| 13 | 厦门海关技术中心 | 普旭力 研究院 |
| 14 | 国际食品质量安全监督检验中心 | 林立 教授级 |
| 15 | 科研院所 | 中国农业科学院蜜蜂研究所 | 周金慧 研究员 |
| 16 | 陈黎红 研究员 |
| 17 | 吉林省养蜂科学研究所 | 王志 研究员 |
| 18 | 农业农村部食物与营养发展研究所 | 朱大洲 研究员 |
| 19 | 中国热带农业科学院环境与植物保护研究所 | 高景林 研究员 |
| 20 | 企 业 | 中国蜂产品协会 | 罗照明 主任 |
| 21 | 杭州天厨蜜源保健品有限公司 | 王磊 主任 |
| 22 | 天津梦得集团有限公司 | 屈雪盈 研发总监 |

### 标准预审

2023年5月6日，蜂业标准化工作组组织专家对中国农业科学院蜜蜂研究所等单位起草的农业行业标准《蜂王浆中蜂王浆主蛋白4的测定 酶联免疫吸附法》（预审稿）进行了认真审查。专家组由李俊玲、常碧影、贾光群、罗丽萍、樊霞、玄红专、陈辉组成。在听取起草专家汇报的基础上对本标准形成了预审意见，预审意见处理汇总表见附件3。

2023年5-2023年6月，根据标准预审会专家意见，统一测试样品和对照品添加量后，委托农业农村部奶及奶制品质量监督检验测试中心（北京）、农业农村部蔬菜品质质量监督检验测试中心（北京）和秦皇岛海关技术中心，再次进行了本方法的三家单位验证工作，并出具验证报告。

2023年6月-2023年7月，根据标准预审会专家提出的意见或建议，完善补充了标准，形成了标准公开征求意见稿，提交全国畜牧业标准化技术委员会秘书处。

# 二 标准编制原则和主要技术内容确定的依据

## （一）标准编制原则

本标准在制订过程中严格遵循国家有关方针、政策和法规，并且遵循标准制订过程中的先进性、经济性和适用性原则，按照GB/T 1.1-2020《标准化工作导则第1部分：标准的结构和编写规则》的要求编写。此外，在标准制订和撰写的过程中力求做到技术内容的叙述正确无误；文字表达准确、简明、易懂；标准的构成严谨合理；内容编排、层次划分等符合逻辑与规定。制标单位在制定标准前查阅了大量资料，开展了多项研究，并进行了大量的样品测试，验证方法的适用性，实现对蜂王浆和蜂王浆冻干粉中MRJP4的准确定量。

## （二）主要技术内容确定的依据

### 1. 试剂盒开发

**1.1 MRJP4基因的序列分析以及抗原序列的选择**

MRJP4基因编码464个氨基酸，无跨膜区，1-21aa为可能信号肽序列，整体蛋白亲水性较好，且序列区别于MRJPs家族其他同源性较高蛋白。经过跨膜区分析、信号肽分析、疏水性分析、无序序列分析、抗原性分析、同源性分析和结构域分析，最终选定MRJP4（>gi|58585170|ref|NP\_001011610.1| major royal jelly protein 4 precursor [Apis mellifera]，464个氨基酸）中的第132-464位氨基酸（序列中黄色标记）为抗原序列在大肠杆菌中进行表达制备抗原。

>gi|58585170|ref|NP\_001011610.1|

MTKWLLLMVCLGIACQNIRGGVVRENSSGKNLTNTLNVIHKWKYLDYDFDNDERRQAAIQSGEYDRTKNYPLDVDQWHNKTFLAVIRYNGVPSSLNVVSDKTGNGGRLLQPYPDWSFAKYEDCSGIVSAHKIAIDEYERLWVLDSGLVNNTQPMCSPKLFAFDLNTSQLLKQVEIPHDVATTGKGELVSLTVQAMDSTNTMVYMVDNKNTLIIYQNADDSFHRLSSHTLNHNSDKMSDQQENLTLKEVDNKVYGMALSPVTHNLYYNSPSSENLYYVNTESLMKSENQGNDVQYERVQDVFDSQLTVKAVSKNGVLLFGLANNTLSCWNEHQSLDRQNIDVVARNEDTLQMVVSMKIKQNVPQSGRVNNTQRNEYLLALSDRNQNVLNNDLNLEHVNFQILGANVNDLIRNSRCANFDNQDNNHYNHNHNQARHSSKSDNQNNNQHNDQAHHSSKSNNRHNNND

**1.2 抗原的制备和纯化**

合成1.1中的抗原基因进行重组质粒的构建，测序正确后进行大肠杆菌表达抗原蛋白质，采用SDS-PAGE方法检测蛋白质的纯度和分子量大小，获得重组蛋白浓度为2 mg/mL，分子量大小为38 kD，纯度> 80%（图2）。经过纯化后的蛋白质用于动物免疫实验。

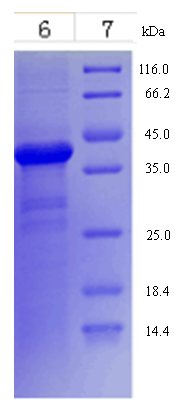


图2. 纯化后的抗原蛋白SDS-PAGE检测结果

**1.3 抗体的制备**

此部分实验操作内容较为繁琐，本章节抗体的制备过程只列出主要步骤和结果，具体的操作步骤和实验流程请查阅本编制说明的附件1。

1.3.1 小鼠免疫及血清效价评价

免疫Balb/c小鼠，8周左右成年雌性，抗原与等体积完全佐剂（首免）和不完全佐剂（加强免疫）混合并进行乳化，充分混合至油包水状态进行皮下多点免疫，2-3次加强免疫，每次免疫间隔周期2周，之后进行效价检测，高于>1:50000后1周内进行腹腔冲击，直接将免疫剂量的抗原溶于PBS中，具体免疫程序见表3。

表3. 小鼠免疫程序

|  |  |  |  |  |  |
| --- | --- | --- | --- | --- | --- |
| 免疫次数 | 免疫原制备 | 免疫途径 | 免疫周期 | 免疫剂量（小鼠） | |
| 一免 | 抗原+完全弗佐+PBS | 皮下（或皮内） | 2-3周 | 50-100 µg/只 | |
| 二免 | 抗原+不完全弗佐+PBS | 皮下（或皮内） | 2周 | 50-80 µg/只 | |
| 三免 | 抗原+不完全弗佐+PBS | 皮下（或皮内） | 2周 | 50-80 µg/只 | |
| 效价以及滴度检测 | 若效价和滴度较低，继续四免 | | 1周 | | |
| 四免 | 抗原+不完全弗佐+PBS | 皮下（或皮内） | 1周 | 50-80 µg/只 | |
| 效价以及滴度检测 | 四免7天后检测，若效价和滴度满足，效价>1:12800，且有滴度，可安排融合 | | | | |
| 冲击加强 | 抗原+PBS | 腹腔 | 融合前3天 | | 50-100 µg/只 |

免疫后效价检测方法：间接法检测血清效价，血清效价检测结果见表4。根据效价检测结果可见，免疫后小鼠血清效价好，灵敏度较高，完全满足后续实验要求。

表4. 血清效价检测结果





1.3.2 细胞融合

末次冲击3天后，摘除眼球处死，并收集阳性对照血，取出脾脏，制备成单细胞悬液，然后取出处于对数期的SP2/0细胞处理后，与脾细胞以一定比例混合（1:5-1:10），50% PEG1450作用1 min，以基础培养基DMEM稀释终止，低速离心后，再用含20%胎牛血清的HAT培养基轻轻悬浮并混匀，按照2×107/板铺至预先准备好的饲养层细胞板里，置于5% CO2，36℃下培养。

1.3.3 细胞建株

A. 融合板检测

待融合板换液细胞长至中等大小约1万个细胞以上开始检测（检测方法为ELISA方法）在ELISA质控合格（即阴性对照<0..2，阳性对照>1.0）后挑选阳性孔（一般OD450≥0.5）作亚克隆。

检测方法：本效价检测-间接ELSIA。

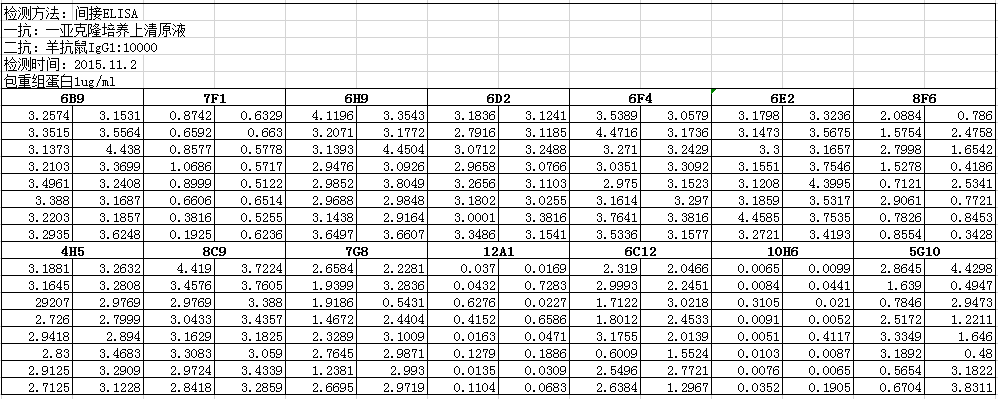
细胞融合检测结果：进行半固体和液体融合共12板，一共获得阳性细胞株64株；其中效价值OD>2.0的有50株；OD在1.0-2.0之间的有14株。

B. 亚克隆方法及检测

从上述结果中挑出融合板中检测阳性值高的孔进行有限稀释，以每板60%的单克隆孔数量计数做亚克隆，每次均挑取阳性值较高的单克隆孔进行有限稀释，每次亚克隆5-7天即可进行ELISA检测，直到最终筛选出能稳定分泌阳性抗体的单克隆细胞株进行扩大培养。

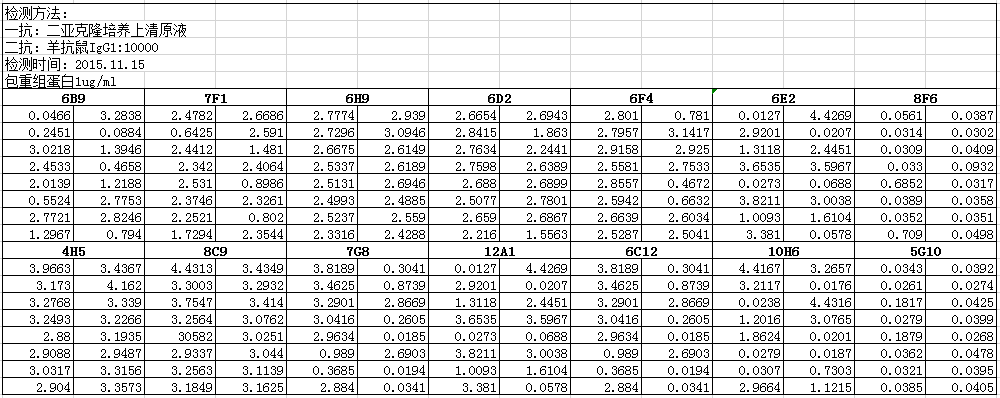
1）第一次亚克隆检测

表5. 第一次亚克隆结果



2）第二次亚克隆结果

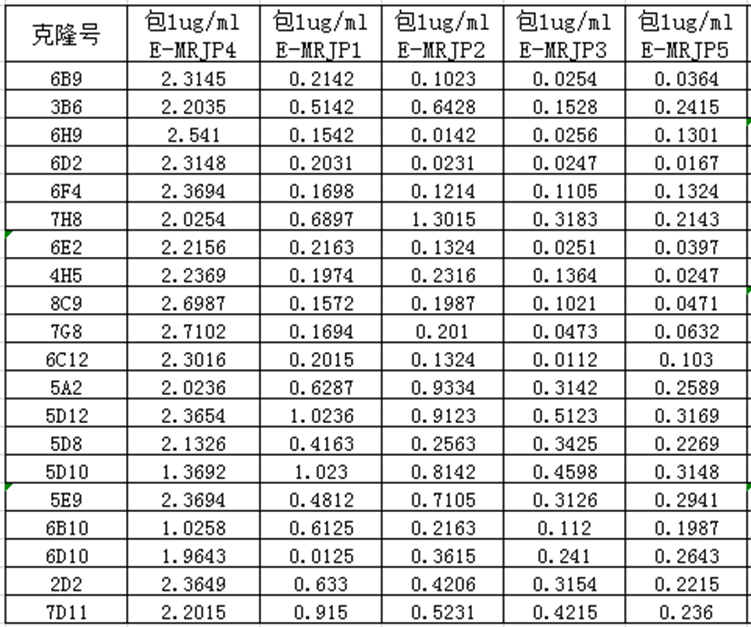
表6. 第二次亚克隆结果

MRJP4阳性较多，融合检测后筛选出52株阳性，挑选其中的20株进行一亚，一亚检测后筛选出14株二亚。

C. MRJP4特异性细胞株筛选

经过与重组蛋白和天然蛋白交叉反应检测，去除有交叉反应的细胞株，最终获得9株MRJP4融合细胞株。根据表7的部分结果可见，MRJP4与其余四种重组蛋白共有10株交叉。

表7. MRJP4特异性细胞株筛选结果



MRJP4与重组蛋白筛完交叉后，选取测试结果较好的20株与天然蛋白MRJP1、MRJP2测交叉，交叉测定结果见表8。

表8. 交叉测定结果

|  |  |  |  |  |  |
| --- | --- | --- | --- | --- | --- |
| 包1 μg/mL天然MRJP1（单） | | | 包1 μg/mL天然MRJP2 | | |
| 0.0174 | 1.2561 | 0.8412 | 0.0154 | 1.0984 | 1.0362 |
| 0.0215 | 0.6415 | 0.6354 | 0.0147 | 0.7412 | 0.9412 |
| 0.0165 | 0.4289 | 0.0152 | 0.0326 | 0.6315 | 0.0327 |
| 0.0412 | 0.9871 | 0.0125 | 0.0258 | 1.0445 | 0.5305 |
| 0.0326 | 0.8125 | — | 0.0251 | 0.5873 | — |
| 0.0512 | 0.3615 | — | 0.0216 | 0.6125 | — |
| 0.6489 | 0.0152 | — | 1.7423 | 0.0132 | — |
| 1.2364 | 0.0014 | — | 0.9458 | 0.0236 | — |

由表8可见，MRJP4与天然蛋白MRJP1、MRJP2有11株交叉，故 MRJP4现剩余9株，其中8C9的灵敏度和特异性最佳。

D. 细胞株冻存鉴定

在细胞株冻存完毕后必须复苏同一批次中的一支进行鉴定，鉴定标准：①复苏活细胞数≥100万个细胞/支；②活细胞中有活力细胞≥50万/株；③复苏细胞中不能有除细胞株细胞以外的其它微生物(如:细菌.真菌.支原体等)出现；④复苏细胞生长到一定数目后选出生长好的细胞作单克隆计数铺板，并检测单克隆的分泌抗体能力是否全阳或有抗体分泌；⑤细胞培养上清也需作ELISA，以确定是否分泌阳性抗体的同时做Western-Blotting的鉴定（见图3）。

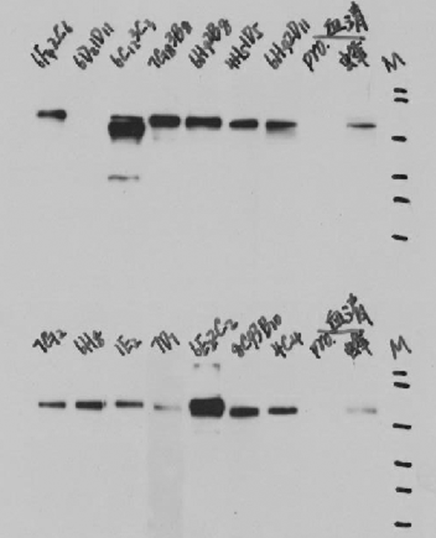


图3. 抗体western-boltting鉴定结果

所有泳道：蜂王浆样本15 μL；泳道1-7：细胞培养上清；泳道8：MRJP4 小鼠抗血清1:1000；二抗: IgG(H+L)-HRP(1:5000)；Marker：120/85/50/35/25/20（kD）

1.3.4 抗体表位检测及抗体配对筛选

A. 通过阻断实验进行抗原表位配对检测

首先通过梯度试验确定8C9生物素标记抗体的稀释比例，梯度试验的结果见表9。

表9. 8C9生物素标记抗体的稀释梯度实验结果



由上述结果选择标记抗体的稀释比例为1/50000，进行接下来的阻断实验。

阻断实验的检测方法为间接竞争ELISA方法：

包被浓度为1 μg/mL，CB直包；一抗检测：50 μL标记抗体+ 50 μL检测抗体；阴性对照为：50 μL标记抗体+ 50 μL自身抗体；阳性对照为：50 μL标记抗体+ 50 μL SP2/0培养上清；筛选结果见表10。

表10. 阻断实验的筛选结果



根据表10的阻断实验结果可见，6H9与标记抗体为不同表位。选取与标记抗体8C9不同表位的6H9进行腹水制备、抗体纯化及标记实验，经效价检测显示2株抗体均具有较高亲和力，进入下一阶段的研发实验。

B. 抗体特异性检测

抗体8C9（左）和6H9（右）的特异性检测结果见图4。从特异性检测结果可见，抗体6H9以及抗体8C9只与只与MRJP4发生特异性反应反应，与MRJP1、MRJP2、MRJP3以及MRJP5均无交叉反应。

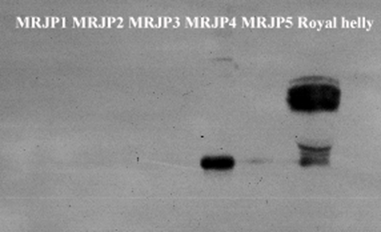


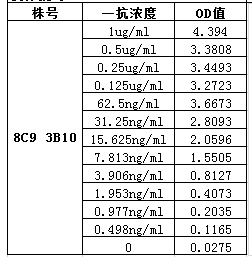
图4. 抗体特异性检测

各泳道从左至右分别是：MRJP1、MRJP2、MRJP3、MRJP4、MRJP5、蜂王浆。

1.3.5抗体效价及特异性检测

采用间接ELISA方法（见附件）检测抗体6H9和8C9的效价结果见表11和图5。

表11. 抗体6H9和8C9的效价检测的结果



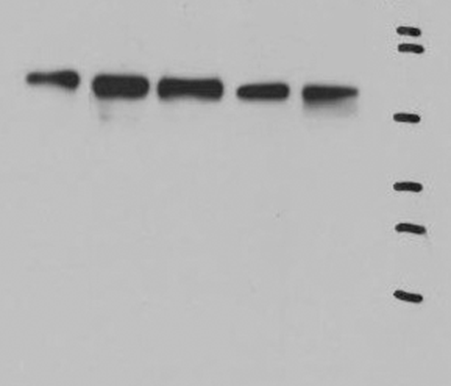


图5. 蜂王浆样本的抗体WB验证

所有泳道：蜂王浆样本15μL；从左至右泳道1：6E2 2C2抗体1/1000；泳道2：7G8 3B8抗体1/1000；泳道3：6H9 2B8抗体1/1000；泳道4：4H5 1D5抗体1/1000；泳道5：8C9 3B10抗体1/1000；二抗: IgG(H+L)-HRP(1:5000)；Marker：120/85/50/35/25/20（kDa）

**1.4配对标准曲线确定**

1.4.1 初步滴定：挑选8C9以及6H9这两对配对的抗体对进行初步滴定试验：

试验方法：双抗夹心方法；6H9 2 μg/mL CB直包；8C9 为检测抗体，生物素标记，稀释比例1:2000；HRP 1:4000；试验反应时间：2 h+1 h+1 h+20 min；配对的抗体对进行初步滴定试验结果见表12。

表12. 双抗夹心方法的抗体对进行初步滴定试验结果

|  |  |  |  |
| --- | --- | --- | --- |
| 标曲 | OD1 | OD2 | 平均 OD |
| 1 μg/mL | 3.1633 | 3.2145 | 3.1889 |
| 500 ng/mL | 3.1483 | 3.1579 | 3.1531 |
| 100 ng/mL | 1.6819 | 1.6247 | 1.6533 |
| 50 ng/mL | 1.0125 | 0.9875 | 1.0000 |
| 10 ng/mL | 0.4532 | 0.4614 | 0.4573 |
| 5 ng/mL | 0.1798 | 0.1249 | 0.1524 |
| 2.5 ng/mL | 0.0357 | 0.0426 | 0.0392 |
| 0 | 0.1001 | 0.1053 | 0.1027 |

1.4.2 棋盘滴定：

摸索捕获抗体、标记抗体及样本的稀释比例；

试验方法：双抗夹心方法；6H9 CB直包；8C9 为检测抗体，生物素标记；HRP 1:4000，试验反应时间：2 h+1 h+1 h+20 min；棋盘滴定摸索捕获抗体、标记抗体及样本的稀释比例的结果见表13。

表13. 棋盘滴定摸索捕获抗体、标记抗体及样本的稀释比例的结果

|  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |
| --- | --- | --- | --- | --- | --- | --- | --- | --- | --- |
|  | 6H9 1μg/mL包，8C9-Bio 1:4000检 | | | 6H9 2μg/mL包，8C9-Bio 1:8000检 | | | 6H9 4μg/mL包，8C9-Bio 1:8000检 | | |
| 标曲（ng） | OD1值 | OD2值 | Mean OD值 | OD1值 | OD2值 | Mean OD值 | OD1值 | OD2值 | Mean OD值 |
| 200 | 2.7346 | 2.8105 | 2.7726 | 2.2139 | 2.2729 | 2.2434 | 2.2574 | 2.3105 | 2.2840 |
| 100 | 1.5788 | 1.5934 | 1.5861 | 1.2273 | 1.2918 | 1.2595 | 1.3571 | 1.3057 | 1.3314 |
| 50 | 0.9004 | 1.0231 | 0.9618 | 0.7422 | 0.7678 | 0.7550 | 0.7523 | 0.7712 | 0.7618 |
| 25 | 0.4642 | 0.5102 | 0.4872 | 0.4361 | 0.4536 | 0.4449 | 0.4033 | 0.4468 | 0.4251 |
| 12.5 | 0.2524 | 0.2631 | 0.2578 | 0.2453 | 0.2665 | 0.2559 | 0.2566 | 0.2615 | 0.2591 |
| 6.25 | 0.1904 | 0.1849 | 0.1877 | 0.1574 | 0.1425 | 0.1500 | 0.1818 | 0.1634 | 0.1726 |
| 3.125 | 0.1577 | 0.1624 | 0.1601 | 0.1143 | 0.1103 | 0.1123 | 0.1228 | 0.1143 | 0.1186 |
| 0 | 0.0821 | 0.0156 | 0.0489 | 0.0656 | 0.0185 | 0.0421 | 0.0985 | 0.0178 | 0.0582 |

1.4.3 稀释条件优化

A. 根据上述摸索的包被抗体、检测抗体的稀释条件，进行初步测样：

双抗夹心方法；6H9 1μg/mL CB直包CB直包；8C9 为检测抗体，生物素标记，稀释比例1:2000；HRP 1:4000;试验反应时间：2 h+1 h+1 h+20 min; 初步测样结果见表14。

表14. 初步测样的结果

|  |  |  |  |  |  |
| --- | --- | --- | --- | --- | --- |
| 标曲（ng/mL） | OD值 | OD2值 | 平均OD | 样本 | OD值 |
| 200 | 3.1848 | 3.0542 | 3.1195 | 蜂王浆 1:300 | 3.095 |
| 100 | 2.9796 | 2.8795 | 2.9296 | 蜂王浆 1:300 | 3.177 |
| 50 | 2.1159 | 2.2105 | 2.1632 | 蜂王浆 1:300 | 3.4243 |
| 25 | 1.2531 | 1.2634 | 1.2583 | 蜂王浆 1:300 | 2.8752 |
| 12.5 | 0.7618 | 0.8123 | 0.7871 | 蜂王浆 1:300 | 3.7793 |
| 6.25 | 0.47 | 0.4916 | 0.4808 |  |  |
| 3.125 | 0.3462 | 0.3215 | 0.3339 |  |  |
| 0 | 0.2185 | 0.2018 | 0.2102 |  |  |

双抗夹心方法；6H9 1μg/mL CB直包CB直包；8C9 为检测抗体，生物素标记，稀释比例1:3000；HRP 1:4000；试验反应时间：2 h+1 h+1 h+20 min; 初步测样结果见表15。

表15. 初步测样的结果

|  |  |  |  |  |  |
| --- | --- | --- | --- | --- | --- |
| 标曲（ng/mL） | OD1值 | OD2值 | 平均OD | 样本 | OD值 |
| 100 | 2.5877 | 2.6043 | 2.5960 | 蜂王浆 1:1500 | 1.8496 |
| 50 | 1.6016 | 1.6473 | 1.6245 | 蜂王浆 1:3000 | 1.4151 |
| 25 | 0.8974 | 0.9123 | 0.9049 | 蜂王浆 1:6000 | 1.1269 |
| 12.5 | 0.5165 | 0.5548 | 0.5357 | 蜂王浆 1:12000 | 0.8302 |
| 6.25 | 0.3251 | 0.3625 | 0.3438 | 王浆冻干粉 1:1500 | 1.3173 |
| 3.125 | 0.2283 | 0.2432 | 0.2358 | 王浆冻干粉 1:3000 | 0.9016 |
| 1.563 | 0.2008 | 0.1352 | 0.1680 | 王浆冻干粉 1:6000 | 0.6244 |
| 0 | 0.1269 | 0.1126 | 0.1198 | 王浆冻干粉 1:12000 | 0.3529 |

B．将冻干对照品进行再次测定：

双抗夹心方法；6H9 1μg/mL CB直包CB直包；8C9 为检测抗体，生物素标记，稀释比例1:3000；HRP 1:4000;试验反应时间：2 h+1 h+1 h+20 min；冻干对照品再次测定结果见表16、表17。

表16. 冻干对照品的测定结果

|  |  |  |  |  |  |
| --- | --- | --- | --- | --- | --- |
| 标曲（ng/mL） | OD1值 | OD2值 | 平均OD | 样本 | OD值 |
| 100 | 2.6571 | 2.6952 | 2.6762 | 蜂王浆 1:1600 | 1.6968 |
| 50 | 1.6878 | 1.6248 | 1.6563 | 蜂王浆 1:3200 | 0.9778 |
| 25 | 0.985 | 1.0025 | 0.9938 | 蜂王浆 1:6400 | 0.6108 |
| 12.5 | 0.614 | 0.6935 | 0.6538 | 蜂王浆 1:12800 | 0.4542 |
| 6.25 | 0.4356 | 0.4636 | 0.4496 | 蜂王浆 1:25600 | 0.3245 |
| 3.125 | 0.2819 | 0.2359 | 0.2589 | 蜂王浆 1:51200 | 0.2542 |
| 1.563 | 0.1404 | 0.1259 | 0.1332 | 蜂王浆 1:102400 | 0.2344 |
| 0 | 0.1293 | 0.1068 | 0.1181 | 样稀 | 0.1801 |

表17. 样本定量结果

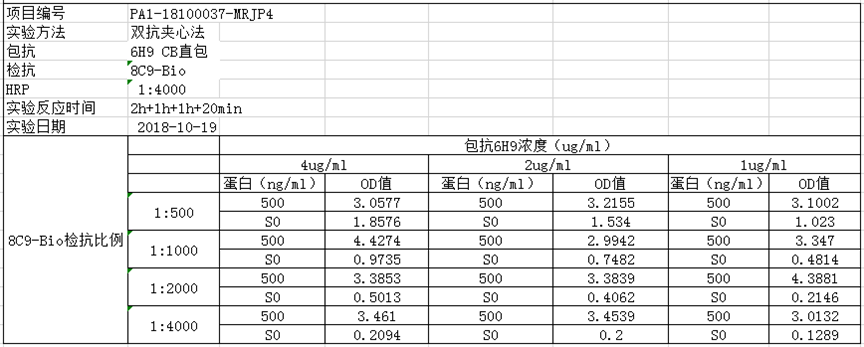
|  |  |  |  |
| --- | --- | --- | --- |
| 样本 | OD值 | 代入公式计算浓度（ng/mL） | 实际浓度（ng/mL） |
| 蜂王浆 1:1600 | 1.6968 | 52.20017203 | 83520.27525 |
| 蜂王浆 1:3200 | 0.9778 | 23.14169658 | 74053.42907 |
| 蜂王浆 1:6400 | 0.6108 | 11.84138043 | 75784.83478 |
| 蜂王浆 1:12800 | 0.4542 | 7.723859319 | 98865.39928 |
| 蜂王浆 1:25600 | 0.3245 | 4.610880958 | 118038.5525 |
| 蜂王浆 1:51200 | 0.2542 | 3.030799997 | 155176.9598 |
| 蜂王浆 1:102400 | 0.2344 | 2.598937038 | 266131.1527 |

1.4.4标准曲线设置

标准曲线的设置原则以样本检出浓度为基准，即此曲线需包含各样本的检出浓度范围。固定对照品的浓度，选取不同的包检、检抗及二抗的浓度进行棋盘滴定实验（见表18），以此选取各个参数合适的浓度条件。

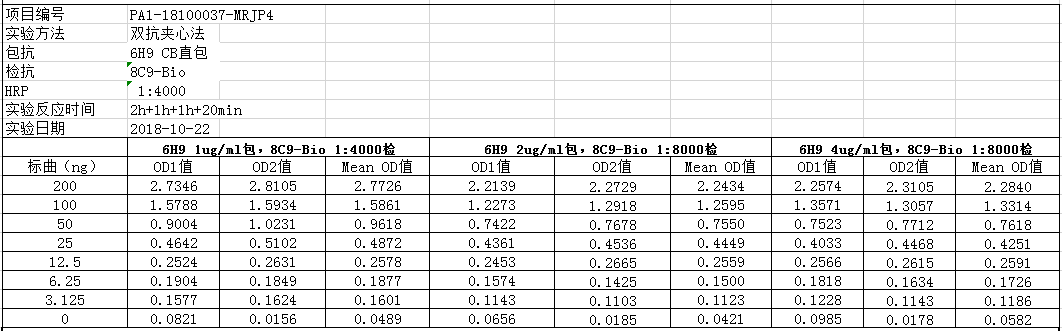
将待测的抗体按照图中标注的1 µg/mL、2 µg/mL、4 µg/mL分别包被，36 ℃ 2 h或者4 ℃过夜；封闭后重组蛋白为对照品：对照品设置S7和S0添加到96孔中，50 µL/孔，36 ℃ 2 h；生物素标记的抗体按照推荐的稀释比例加入96孔中，90 µL/孔，36 ℃ 1 h；底物反应，酶标仪450 nm测定吸光值，表18。

表18. 采用不同浓度抗体设置标准曲线



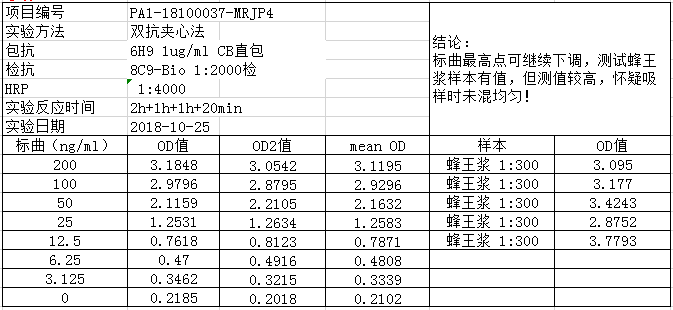
通过适当调整包抗、检抗及HRP的浓度来优化标准曲线，确保标曲R2≥0.99视为合格，表19。

表19. 第一次标准曲线摸索



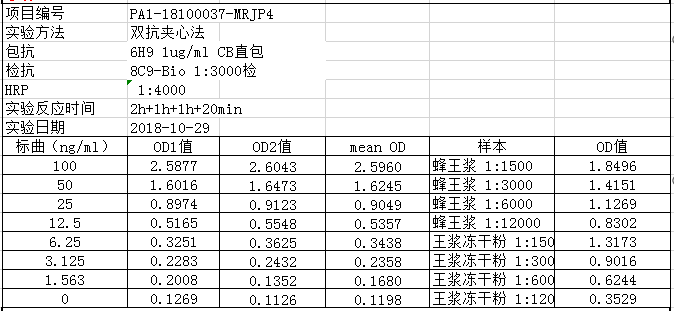
从以上三组条件测试结果来看，标曲线性均较好，但低值较低；根据测样结果进一步调试标曲，表20。

表20. 第二次标准曲线摸索



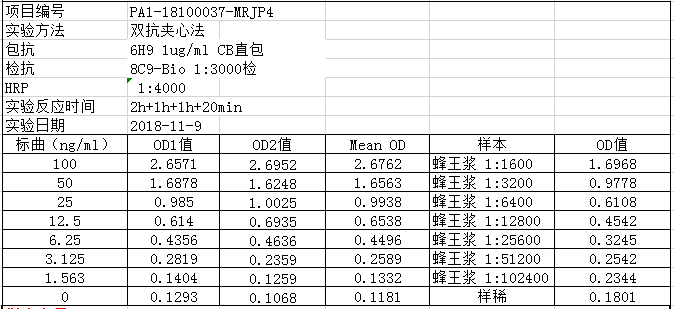
结果显示标曲最高点可继续下调，测试蜂王浆样本有值，第三次调整标准曲线，表21。

表21. 第三次标准曲线摸索



从标曲线性来看，1 μg/mL包被，1:3000检的条件更合适；测试不同稀释比的样本，OD值随稀释比例的降低呈线性下降，符合预期；改变标品形态，测试稳定性，表22和图6。

表22. MRJP4测不同稀释倍数的样本



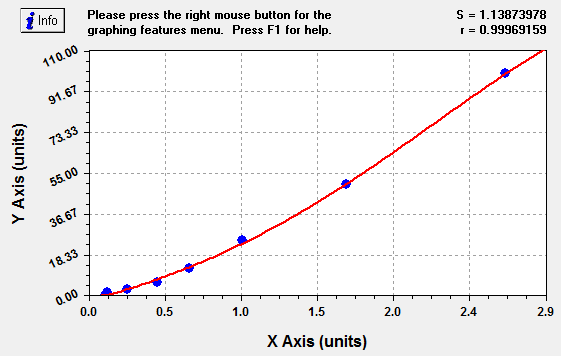


图6. ELISA试剂盒标准曲线

通过抗原筛选、小鼠免疫、免疫细胞株筛选、抗体纯化、抗体特异性和灵敏度检测、抗体配对筛选、标准曲线确定的研究，完成了MRJP4 ELISA试剂盒的开发。

### 2. 检测方法的确定

2.1 可溶性蛋白质的提取

蜂王浆中的可溶性蛋白质直接采用水提取制成贮备液。取1.0 g蜂王浆溶于水中，定容至2、5、10、20、50 mL后进行充分溶解，室温（20℃ ± 5℃）充分振荡20 min，或者低温（< 20℃）超声10 min，取1.5 mL溶液于4℃，12,000 rpm离心 15 min，取上清液。通过可溶性蛋白质浓度的测定，发现10 mL水足以溶解蜂王浆中的可溶性蛋白质。考虑实验可操作性，最终选择50 mL体积为实验提取条件，表23。

表23. 蜂王浆样品贮备液制备

|  |  |  |  |  |  |  |  |
| --- | --- | --- | --- | --- | --- | --- | --- |
|  | 浓度1  ng/μL | 浓度 2  ng/μL | 浓度 3  ng/μL | 浓度 4  ng/μL | 浓度 5  ng/μL | 可溶性蛋白含量(%) | |
| A | 62.6757 | 65.9249 | 62.9465 | 64.0704 | 61.3806 | 12.68 | |
| B | 30.7523 | 29.4554 | 30.8308 | 29.6862 | 30.3956 | 15.11 | |
| C | 16.9965 | 16.8264 | 17.3106 | 17.5309 | 17.1247 | 17.16 | |
| D | 8.8812 | 8.9231 | 8.7238 | 8.2564 | 8.2237 | 17.20 | |
| E | 3.4013 | 3.4128 | 3.4711 | 3.3940 | 3.3786 | 17.06 |

注：A, 1 g 蜂王浆溶至2 mL; B, 1 g 蜂王浆溶至5 mL; C, 1 g 蜂王浆溶至10 mL; D, 1 g 蜂王浆溶至20 mL；E, 1 g 蜂王浆溶至50 mL。

### 2.2 蜂王浆实际样品的检测

按试剂盒操作进行新鲜蜂王浆样品中MRJP4含量的定量检测。检测标准曲线见图7。取1 g蜂王浆样品溶于水中，定容至50 mL，室温（20℃ ± 5℃）充分振荡20 min，或者低温（< 20℃）超声10 min后，取1.5 mL于4 ℃，12, 000 rpm离心15 min，取上清成为样品储备液。分别将样品再稀释10、20、40、100、200、400倍，进行同一样品不同稀释度的检测，结果见表25。蜂王浆稀释10、20、40倍后的吸光度值超出了标准曲线的范围，显示为非数字；而稀释100、200和400倍后测量值基本一致，见表24。最终我们选择200倍为样品测量稀释倍数。

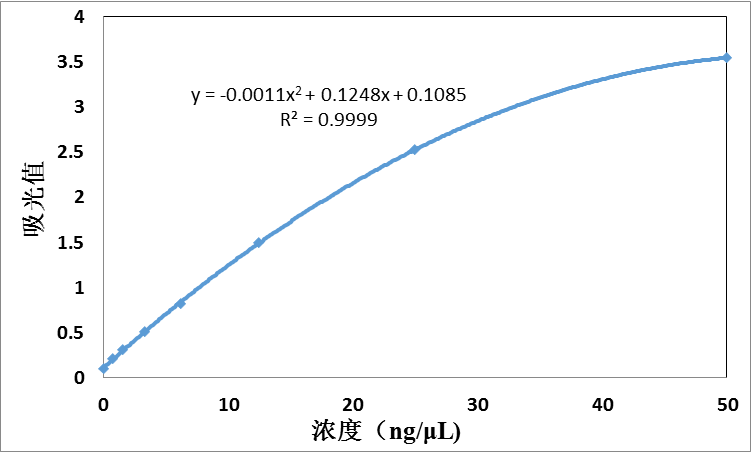


图7. MRJP4测样标准曲线

表24. 同一蜂王浆样品稀释不同倍数检测的吸光值和含量

|  |  |  |  |  |  |  |
| --- | --- | --- | --- | --- | --- | --- |
| 蜂王浆样品 | OD1 | OD2 | OD3 | Mean OD | SD | 含量均值（mg/kg RJ） |
| 稀释10倍 | 3.8446 | 3.8799 | 3.8349 | 3.8531 | 0.0193 | 非数字 |
| 稀释20倍 | 3.8057 | 3.7863 | 3.8809 | 3.8243 | 0.0408 | 非数字 |
| 稀释40倍 | 3.5792 | 3.7426 | 3.7277 | 3.6832 | 0.0738 | 非数字 |
| 稀释100倍 | 2.5473 | 2.7106 | 2.9361 | 2.7313 | 0.1594 | 200.36 |
| 稀释200倍 | 1.5872 | 1.6911 | 1.8922 | 1.7235 | 0.1266 | 225.80 |
| 稀释400倍 | 0.8352 | 0.9620 | 0.9946 | 0.9306 | 0.0688 | 207.09 |

取不同贮存条件下的蜂王浆样品各1.0 g，溶于水中，定容至50 mL，室温振荡20 min或20℃超声10 min后，取1.5 mL于4 ℃，12,000 rpm离心15 min，取上清成为样品储备液；取50 μL上清，加入950 μL水中稀释，充分振荡混匀（稀释20倍）；取50 μL稀释溶液，加入450 μL样品稀释液中，充分混匀后进行加样（稀释10倍），每孔20 μL，每个样品3个重复，检测结果见表25。

表25. 不同存放条件下蜂王浆中MRJP4含量的测量值（mg/kg）

|  |  |  |  |  |
| --- | --- | --- | --- | --- |
| 贮存条件 | -20 ℃ | 4 ℃ | RT | 36 ℃ |
| 1 d | — | — | — | 98.17±1.1705 |
| 2 d | — | — | — | 80.99±1.7510 |
| 3 d | — | 189.49±4.2481 | 183.15±1.6711 | 80.36±3.4540 |
| 5 d | — | — | — | 43.65±0.9173 |
| 7 d | 202.07±0.9182 | 167.52±5.5954 | 143.06±0.3519 | 35.28±0.5015 |
| 10 d | — | 174.51±6.8188 | 134.51±7.4788 | — |
| 2 w | 202.73±6.4786 | 171.41±5.4252 | 133.16±6.6202 | — |
| 4 w | 202.00±7.2022 | 143.06±0.3519 | 96.57±4.8157 | — |
| 6 w | 199.16±6.4786 | 132.79±5.7385 | 68.324±3.7738 | — |
| 8 w | 202.00±1.8907 | 128.65±4.0298 | 53.149±0.4880 | — |
| 16 w | 198.00±7.9333 | 78.87±1.5786 | 32.315±1.3218 | — |
| 24 w | 203.33±4.1255 | 61.57±3.9215 | — | — |
| Control | 206.83±1.5293 | | | |

为了验证此方法的可行性，2020年的3-8月，我们从全国14省市共计采集160个新鲜蜂王浆样品：东北地区（黑龙江省、北京市、辽宁省和吉林省）的50个样品，西部地区（青海省和新疆维吾尔自治区）的40个样品，中部地区（河南省、湖北省和重庆市）的22个样品，东南部地区（包括安徽省、福建省、江苏省、江西省和浙江省）的41个样品。采用本方法对这160个样品进行检测，MRJP4的含量范围在50 mg/kg ~ 1000 mg/kg蜂王浆，平均含量为315.96 mg/kg 蜂王浆。

按试剂盒操作进行蜂王浆冻干粉样品中MRJP4含量的定量检测。取0.5 g蜂王浆样品溶于水中，定容至50 mL，室温（20℃ ± 5℃）充分振荡20 min，或者低温（< 20℃）超声10 min后，取1.5 mL于4 ℃，12, 000 rpm离心15 min，取上清成为样品储备液；再将样品储备液稀释50、100、200和400倍，进行同一样品不同稀释度的检测，结果见表26。蜂王浆冻干粉样品稀释50和100倍后的吸光度值超出了标准曲线的范围，显示为非数字；而稀释200和400倍后测量值基本一致，见表26。最终我们选择400倍为样品测量稀释倍数。

表26. 同一蜂王浆样品稀释不同倍数检测的吸光值和含量

|  |  |  |  |  |  |  |
| --- | --- | --- | --- | --- | --- | --- |
| 冻干粉样品 | OD1 | OD2 | OD3 | Mean OD | SD | 含量均值（mg/kg） |
| 稀释50倍 | 3.7330 | 3.8720 | 3.8946 | 3.8332 | 0.0875 | 非数字 |
| 稀释100倍 | 3.5310 | 3.5430 | 3.6020 | 3.5587 | 0.0380 | 非数字 |
| 稀释200倍 | 2.5810 | 2.4850 | 2.6340 | 2.5667 | 0.0755 | 1100 |
| 稀释400倍 | 1.2600 | 1.2580 | 1.4460 | 1.3213 | 0.1080 | 1070 |

为了验证此方法的可行性，2020年的10-12月，我们收集了12个蜂王浆冻干粉样品进行MRJP4含量的检测，含量范围在700 mg/kg ~ 1800 mg/kg冻干粉，平均含量为1092.71 mg/kg 冻干粉。

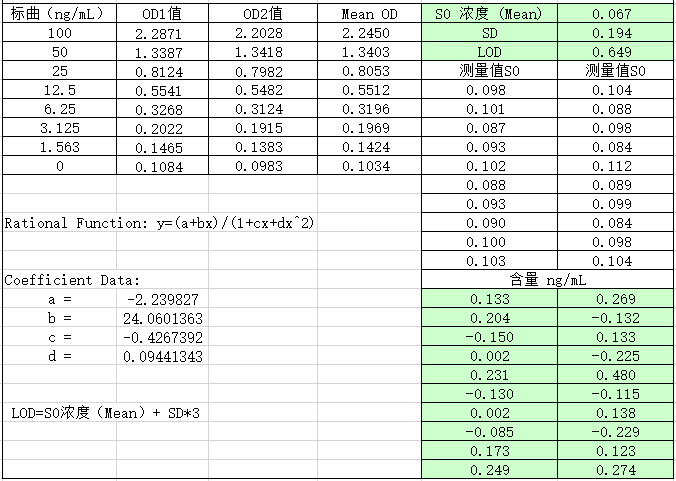
2.3 试剂盒检出限和定量限的确立

2.3.1最低检测限（LOD）的确立

一般满足在标曲最低端浓度的二分之一。公式：20份空白样品测定均值加上3倍标准差，测得LOD为0.649 ng/mL（表27）；依据国标《GB/T 27415-2013 分析方法检出限和定量限的评估》，20份空白样品的校正因子为an’为1.013，根据公式（2）计算，

本方法的最低检出限为0.657 ng/mL（表27），即 6.57 mg/kg。

表27. 最低检测线的确定



2.3.2定量限（LOQ）的确定

分别通过不同批次标准曲线的测量精密度（相对标准偏差，RSD%），实际样品测量MRJP4含量的RSD%，以及蜂王浆冻干粉样品稀释不同倍数后测得MRJP4含量检测值的精确度，确定本方法测定蜂王浆和蜂王浆冻干粉的定量限。

使用RSD%对不同批次试剂盒或不同时间点进行检测的5次标准曲线结果进行标准曲线测量精密度的比较，以精密度≤20%作为要求，6.25 ng/mL的MRJP4对照品含量是能够准确检出的（表28），即 62.5 mg/kg。

表28. 不同批次标准曲线测量精蜜度

|  |  |  |  |  |  |  |
| --- | --- | --- | --- | --- | --- | --- |
| 标曲浓度  ng/mL |  | 第一次 | 第二次 | 第三次 | 第四次 | 第五次 |
| 0 | 吸光度 | 0.0902 | 0.0998 | 0.1472 | 0.0801 | 0.1298 |
| RSD% | 4.0067 | 5.2104 | 7.8677 | 1.8755 | 14.1759 |
| 1.56 | 吸光度 | 0.1961 | 0.2161 | 0.2281 | 0.1443 | 0.2189 |
| RSD % | 1.8610 | 12.1963 | 9.1939 | 2.8448 | 22.8681 |
| 3.13 | 吸光度 | 0.2906 | 0.3101 | 0.3311 | 0.2148 | 0.3103 |
| RSD % | 1.9143 | 2.4996 | 7.1692 | 1.6314 | 22.2665 |
| 6.25 | 吸光度 | 0.4847 | 0.5129 | 0.5150 | 0.3679 | 0.4347 |
| RSD % | 3.4056 | 2.6226 | 2.2638 | 3.6824 | 8.2366 |
| 12.50 | 吸光度 | 0.8399 | 0.8240 | 0.8751 | 0.5944 | 0.7476 |
| RSD % | 2.9253 | 2.2149 | 1.4055 | 2.0299 | 4.0815 |
| 25.00 | 吸光度 | 1.4486 | 1.4957 | 1.5483 | 1.0608 | 1.1838 |
| RSD % | 1.2145 | 0.5148 | 0.4009 | 3.2407 | 6.0975 |
| 50.00 | 吸光度 | 2.5354 | 2.5331 | 2.3940 | 1.9823 | 2.0546 |
| RSD % | 2.7728 | 1.5554 | 0.3009 | 3.7173 | 5.1286 |
| 100.00 | 吸光度 | 3.4604 | 3.5438 | 3.4845 | 3.1279 | 3.2506 |
| RSD % | 0.9031 | 0.7563 | 0.4053 | 3.6442 | 3.9421 |

选取了15个实际蜂王浆样品进行MRJP4含量的检测和结果进行比较，以RSD%≤20%为标准，含量6.25 ng/mL的MRJP4是能够被准确检测（表29），即62.5 mg/kg。

表29. 实际样品MRJP4含量检测精确度

|  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |
| --- | --- | --- | --- | --- | --- | --- | --- | --- | --- |
| 序号 | 测量值 (ng/mL) | | | 含量 (mg/kg) | | | | | |
| 1 | 2 | 3 | 1 | 2 | 3 | Ave. | STD | RSD% |
| 1 | 64.9900 | 58.5450 | 65.6310 | 649.90 | 585.45 | 656.31 | **630.55** | 39.1918 | 6.2155 |
| 2 | 20.3835 | 20.5515 | 20.6880 | 203.83 | 205.51 | 206.88 | **205.41** | 1.5254 | 0.7426 |
| 3 | 79.4549 | 73.6538 | 71.5543 | 794.55 | 736.54 | 715.54 | **748.88** | 40.9226 | 5.4645 |
| 4 | 6.2844 | 4.4247 | 6.3545 | 62.84 | 44.25 | 63.55 | **56.88** | 10.9453 | 19.2431 |
| 5 | 1.3331 | 2.9926 | 2.1628 | 13.33 | 29.93 | 21.63 | **21.63** | 8.2975 | 38.3640 |
| 6 | 35.5734 | 38.8808 | 37.5574 | 355.73 | 388.81 | 375.57 | **373.37** | 16.6463 | 4.4584 |
| 7 | 45.6008 | 44.8274 | 46.2141 | 456.01 | 448.27 | 462.14 | **455.47** | 6.9488 | 1.5256 |
| 8 | 89.7350 | 88.4399 | 89.0875 | 897.35 | 884.40 | 890.87 | **890.87** | 6.4756 | 0.7269 |
| 9 | 51.9197 | 53.2432 | 52.5814 | 519.20 | 532.43 | 525.81 | **525.81** | 6.6176 | 1.2586 |
| 10 | 56.8685 | 58.9517 | 57.9101 | 568.69 | 589.52 | 579.10 | **579.10** | 10.4159 | 1.7986 |
| 11 | 10.3324 | 11.4483 | 11.6593 | 103.32 | 114.48 | 116.59 | **111.47** | 7.1302 | 6.3967 |
| 12 | 11.3470 | 9.8857 | 9.2788 | 113.47 | 98.86 | 92.79 | **101.71** | 10.6312 | 10.4530 |
| 13 | 12.0618 | 10.8909 | 10.4764 | 120.62 | 108.91 | 104.76 | **111.43** | 8.2225 | 7.3791 |
| 14 | 25.5312 | 26.3906 | 26.2623 | 255.31 | 263.91 | 262.62 | **260.61** | 4.6356 | 1.7787 |
| 15 | 7.6059 | 7.2278 | 7.9185 | 76.06 | 72.28 | 79.19 | **75.84** | 3.4587 | 4.5605 |

表30. 蜂王浆冻干粉样品稀释不同倍数后的MRJP4含量检测精确度

|  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |
| --- | --- | --- | --- | --- | --- | --- | --- | --- | --- | --- | --- | --- | --- | --- | --- | --- | --- | --- |
| 稀释倍数 | 样1 | | | 样2 | | | 样3 | | | 样4 | | | 样5 | | | 样6 | | |
| 检测值ng/mL | 含量mg/kg | 精确度% | 检测值ng/mL | 含量mg/kg | 精确度% | 检测值ng/mL | 含量mg/kg | 精确度% | 检测值ng/mL | 含量mg/kg | 精确度% | 检测值ng/mL | 含量mg/kg | 精确度% | 检测值ng/mL | 含量mg/kg | 精确度% |
| 50 | >最大值 | / | / | >最大值 | / | / | >最大值 | / | / | >最大值 | / | / | >最大值 | / | / | >最大值 | / | / |
| 100 | >最大值 | / | / | >最大值 | / | / | >最大值 | / | / | 78.3755 | 783.76 | 3.02 | 56.1426 | 561.43 | 1.23 | 85.4896 | 854.90 | 1.901 |
| 200 | 57.7450 | 1154.90 | / | 55.0900 | 1101.80 | / | 62.2900 | 1245.80 | / | 40.4067 | 808.13 | / | 28.4200 | 568.40 | / | 43.5733 | 871.47 | / |
| 400 | 28.2544 | 1130.18 | 2.14 | 27.3201 | 1092.80 | 0.82 | 32.4433 | 1297.73 | 4.17 | 19.7567 | 790.27 | 2.21 | 14.5433 | 581.73 | 2.35 | 23.3100 | 932.40 | 6.992 |
| 600 | 18.4767 | 1108.60 | 4.01 | 19.9067 | 1194.40 | 8.40 | 20.8061 | 1248.37 | 0.21 | 14.3407 | 860.44 | 6.47 | 10.2528 | 615.17 | 8.23 | 14.3086 | 858.52 | 1.486 |
| 800 | 15.3633 | 1229.06 | 6.42 | 14.3086 | 1144.69 | 3.89 | 14.7867 | 1182.94 | 5.05 | 11.1426 | 891.41 | 10.31 | 8.2544 | 660.35 | 16.18 | 12.2240 | 977.92 | 12.215 |

称取0.5 g蜂王浆冻干粉样品（精确至0.001 g），加水溶解，定容至50 mL，室温（20℃ ± 5℃）充分振荡20 min，或者低温（< 20℃）超声10 min。取1.5 mL溶液于离心管中，4℃，12,000 r/min离心15 min，取1 .5 mL上清液于一干净离心管中，为待测试样储备溶液。将蜂王浆样品分别稀释50、100、200、400、600、800倍后进行MRJP4的含量检测，结果见表30。由表中结果可见，不同MRJP4含量的冻干粉样品经过稀释后，测量的精确度≤20%要求，试剂盒能够对6.25 ng/mL的MRJP4含量进行准确定量，即62.5 mg/kg。

因此，通过精确度和精密度的实验验证，可确定本方法对蜂王浆和蜂王浆冻干粉中MRJP4检测的定量限为62.5 mg/kg。

此部分研究建立了蜂王浆和蜂王浆冻干粉中MRJP4含量酶联免疫吸附检测方法。采用一级水溶解超声波提取可溶性蛋白质，离心去除杂质，水稀释后，使用酶标仪进行酶联免疫检测。该方法稳定、可操作性强，使用仪器简单，且数据的准确度、精密度和灵敏度能够满足蜂王浆产品中MRJP4检测的要求。

### 3. 其它评价

3.1 MRJP4对照品纯度评价

大肠杆菌重组表达MRJP4蛋白进行了纯化，进行SDS-PAGE检测如图8，重组蛋白分子量为42 kDa，MRJP4浓度为2 mg/mL，纯度>80%。

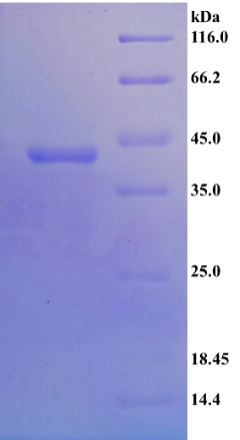


图8. MRJP4重组蛋白SDS-PAGE检测结果

分别拿对照品成品在中国农业科学院蜜蜂研究所和中国农业科学院生物技术研究所进行了质谱检测蛋白质纯度。蜜蜂所采用蛋白质胰酶酶切，高效液相色谱-质谱串联法（QE-HF，thermo）检测，Peaks软件搜库，采用Unique肽段进行定性分析，结果表31和表32。结果显示对照品中只检测到了MRJP4蛋白质，未检测出其它蜜蜂蛋白质。

表31. 对照品样品的蛋白质谱搜库结果

|  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |
| --- | --- | --- | --- | --- | --- | --- | --- | --- | --- | --- |
| Protein Group  蛋白质 | Accession  离子响应 | -10lgP  得分 | Coverage (%)  占比 | Intensity Sample  响应值 | #Peptides  肽段 | #Unique  特异性肽段 | #Spec Sample  谱图 | PTM  修饰 | Avg. Mass  分子量 | Description  名称 |
| 1 | 2.84E+08 | 244.01 | 51 | 6.20E+09 | 38 | 27 | 63 | Carbamidomethylation; Oxidation (M) | 53015 | major royal jelly protein 4 [Apis mellifera] |

表32. 对照品样品中质谱检测到的肽段信息

|  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |
| --- | --- | --- | --- | --- | --- | --- | --- | --- | --- | --- | --- | --- |
| Protein Group  蛋白质 | Peptide  肽段信息 | Unique  特异性 | -10lgP  得分 | Mass  质量 | Length  长度 | Ppm  偏差 | m/z  质荷比 | Z  电荷 | RT  时间 | Intensity Sample  响应值 | Scan  扫描 | #Spec  谱图数 |
| 1 | Y.YVNTESLM(+15.99)KSENQGNDVQYER.V | Y | 70.41 | 2519.124 | 21 | 1.4 | 840.7163 | 3 | 13.03 | 7.03E+07 | 2687 | 1 |
| 1 | R.YNGVPSSLNVVSDKTGNGGR.L | Y | 68.51 | 2019.997 | 20 | -0.7 | 674.3392 | 3 | 14.27 | 3.91E+07 | 3603 | 1 |
| 1 | R.NEDTLQM(+15.99)VVSM(+15.99)K.I | Y | 67.75 | 1425.648 | 12 | 0.9 | 713.8319 | 2 | 14.46 | 1.42E+09 | 3733 | 3 |
| 1 | K.NTLIIYQNADDSFHR.L | Y | 66.06 | 1805.87 | 15 | 1.5 | 602.9647 | 3 | 16.47 | 1.83E+08 | 5038 | 4 |
| 1 | K.YLDYDFDNDERR.Q | Y | 65.91 | 1619.685 | 12 | 1.3 | 810.8509 | 2 | 15.14 | 1.17E+09 | 4186 | 5 |
| 1 | Y.VNTESLM(+15.99)KSENQGNDVQYER.V | Y | 63.34 | 2356.06 | 20 | 1.1 | 786.3615 | 3 | 12.66 | 3.88E+07 | 2401 | 1 |
| 1 | K.YLDYDFDNDER.R | Y | 62.8 | 1463.584 | 11 | 1 | 732.8 | 2 | 17.71 | 7.34E+07 | 5865 | 2 |
| 1 | L.TVQAM(+15.99)DSTNTM(+15.99)VYM(+15.99)VDNK.N | Y | 61.55 | 2094.891 | 18 | 1.2 | 1048.454 | 2 | 13.19 | 2.19E+07 | 2816 | 2 |
| 1 | R.YNGVPSSLNVVSDK.T | Y | 59.74 | 1477.741 | 14 | 2.2 | 739.8795 | 2 | 16.21 | 1.48E+08 | 4886 | 2 |
| 1 | R.NEDTLQM(+15.99)VVSMK.I | Y | 55.96 | 1409.653 | 12 | 1.5 | 705.8348 | 2 | 17.04 | 2.86E+07 | 5418 | 1 |
| 1 | K.QVEIPHDVATTGK.G | Y | 52.67 | 1393.72 | 13 | 0.1 | 465.5807 | 3 | 13 | 2.50E+08 | 2658 | 2 |
| 1 | R.NEYLLALSDR.N | Y | 47.28 | 1192.609 | 10 | 0.5 | 597.312 | 2 | 18.64 | 5.06E+08 | 6462 | 2 |
| 1 | K.YEDC(+57.02)SGIVSAH.K | Y | 46.97 | 1236.508 | 11 | 0.4 | 619.2615 | 2 | 13.05 | 5.42E+07 | 2705 | 1 |
| 1 | K.VYGM(+15.99)ALSPVTH.N | Y | 46.57 | 1189.58 | 11 | 1.1 | 595.798 | 2 | 14.06 | 8.48E+07 | 3474 | 1 |
| 1 | K.VYGM(+15.99)ALSPVTHNLY.Y | Y | 45.29 | 1579.771 | 14 | 1.5 | 790.8937 | 2 | 17.71 | 8.17E+07 | 5867 | 1 |
| 1 | R.VQDVFDSQLTVK.A | Y | 43.96 | 1377.714 | 12 | -0.2 | 689.8641 | 2 | 18.32 | 5.42E+08 | 6258 | 6 |
| 1 | S.LDRQNIDVVAR.N | Y | 43.58 | 1297.71 | 11 | -0.1 | 433.5773 | 3 | 12.88 | 1.42E+07 | 2565 | 1 |
| 1 | K.IAIDEYER.L | N | 43.51 | 1007.492 | 8 | 0.7 | 504.7538 | 2 | 14.16 | 2.41E+09 | 3540 | 2 |
| 1 | Q.SLDRQNIDVVAR.N | Y | 43.17 | 1384.742 | 12 | 0.1 | 462.588 | 3 | 13.08 | 1.99E+07 | 2727 | 1 |
| 1 | H.KIAIDEYER.L | N | 43.17 | 1135.587 | 9 | -0.4 | 379.5362 | 3 | 12.7 | 1.51E+08 | 2428 | 2 |
| 1 | R.QNIDVVAR.N | Y | 42.34 | 913.4981 | 8 | -0.1 | 457.7563 | 2 | 12.72 | 6.12E+08 | 2445 | 1 |
| 1 | L.YYVNTESLM(+15.99)K.S | Y | 41.33 | 1262.585 | 10 | -0.1 | 632.2999 | 2 | 13.69 | 1.90E+07 | 3209 | 1 |
| 1 | F.QILGANVNDLIR.N | Y | 38.43 | 1324.746 | 12 | 1.6 | 663.3815 | 2 | 19.73 | 7.84E+07 | 7166 | 1 |
| 1 | I.RYNGVPSSLNVVSD.K | Y | 34.93 | 1505.747 | 14 | 1.8 | 753.8824 | 2 | 16.82 | 4.09E+06 | 5257 | 1 |
| 1 | L.GANVNDLIR.N | Y | 34.69 | 970.5196 | 9 | 1 | 486.2676 | 2 | 14.04 | 6.85E+08 | 3457 | 2 |
| 1 | G.ANVNDLIR.N | N | 33.71 | 913.4981 | 8 | 0.8 | 457.7567 | 2 | 14.07 | 1.37E+07 | 3481 | 1 |
| 1 | F.DLNTSQLLK.Q | N | 32.39 | 1030.566 | 9 | 1.3 | 516.2909 | 2 | 16.61 | 3.53E+07 | 5130 | 1 |
| 1 | Y.NGVPSSLNVVSDK.T | Y | 31.08 | 1314.678 | 13 | 2.8 | 658.3481 | 2 | 14.55 | 1.44E+07 | 3805 | 1 |
| 1 | R.YNGVPSSLN.V | N | 28.39 | 949.4505 | 9 | 0.6 | 475.7328 | 2 | 14.94 | 5.02E+07 | 4066 | 2 |
| 1 | K.QVEIPHDVATTGKG.E | Y | 24.99 | 1450.742 | 14 | 1.1 | 726.3788 | 2 | 13 | 6.21E+06 | 2664 | 1 |
| 1 | N.TLNVIHEWK.Y | N | 24.24 | 1138.614 | 9 | 4.8 | 570.3168 | 2 | 14.1 | 0 | 3505 | 1 |
| 1 | N.VNDLIR.N | N | 21.96 | 728.4181 | 6 | -0.5 | 365.2162 | 2 | 12.22 | 1.12E+06 | 2094 | 1 |
| 1 | K.TFLAVIR.Y | N | 20.9 | 818.5014 | 7 | 0.9 | 410.2583 | 2 | 17.59 | 3.97E+09 | 5790 | 2 |
| 1 | P.YPDWSFAK.Y | N | 20.81 | 1012.465 | 8 | 1.9 | 507.2409 | 2 | 17.45 | 6.75E+07 | 5699 | 1 |
| 1 | Y.GM(+15.99)ALSPVTHNLY.Y | Y | 20.74 | 1317.639 | 12 | 2.1 | 659.828 | 2 | 15.38 | 2.32E+07 | 4364 | 1 |
| 1 | L.LQPYPDWSFAK.Y | N | 20.7 | 1350.661 | 11 | 1.3 | 676.3386 | 2 | 20 | 1.36E+07 | 7333 | 1 |
| 1 | Y.YNSPSSENLYYVNTESLM(+15.99)K.S | Y | 20.51 | 2254.01 | 19 | 1.4 | 752.345 | 3 | 17.65 | 3.51E+06 | 5827 | 1 |
| 1 | M.ALSPVTHNLYY.N | Y | 19.19 | 1276.645 | 11 | 0.9 | 639.3304 | 2 | 16.55 | 8.59E+06 | 5089 | 1 |
| 1 | T.FLAVIR.Y | N | 18.57 | 717.4537 | 6 | 0.1 | 359.7342 | 2 | 15.44 | 3.29E+07 | 4404 | 1 |

中国农业科学院生物技术所采用纳升液相色谱质谱联用仪（Waters nanoACQUITY UPLC-SYNAPT-G2-Si），不经过酶切，直接进样检测，检测结果如图9，MRJP4蛋白纯度>80%。



图9. MRJP4纯度检测质谱图谱

3.2 MJRP4对照品溶液有效期的确定

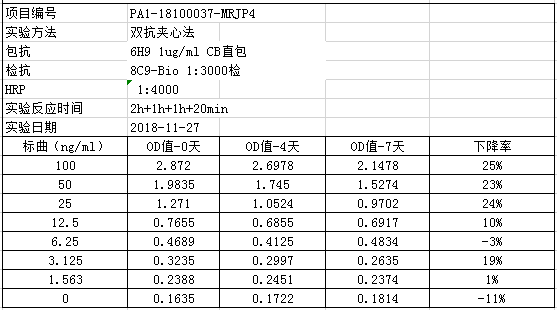
蜂王浆主蛋白4对照品，干粉冻于-20℃可以保存1年；溶解后的对照品溶液（100 ng/mL）可在2~8℃保存7天；为保证实验有效性，建议每次实验使用新的对照品。

3.3 试剂盒稳定性评价

3.3.1 热稳定性评价

含4天及7天的稳定性，测试方法如下：分别将包被板（已包被抗体）、对照品（冻干粉）、中间浓度检抗各2套放置于36 ℃培养箱，于4天后取出一套，7天后取出一套；7天后将放热破的2套原料与4 ℃放置的原料一起做标曲的比较，计算OD值的下降率。36℃培养箱热破7天后，下降率≤30%即视为稳定性合格（表33）。

表33. 36℃热破坏



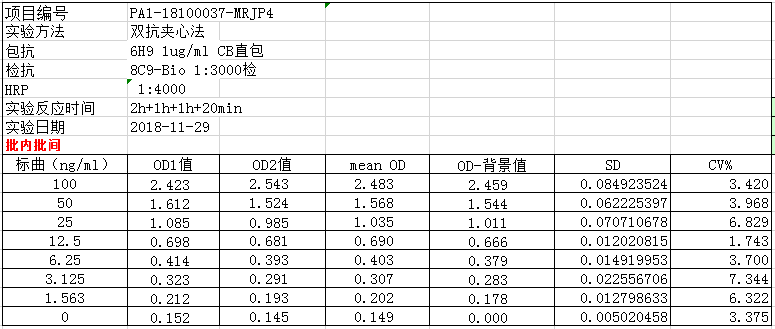
热稳定性7天下降均＜30%，热稳合格，进入下一步批内批间！

3.3.2 批内批间差

批内变异系数：要求≤8%，方法：测试高、中、低浓度各24份，用其标准差/平均值×100%，即为其变异系数值。

批间变异系数：要求≤10%，方法：测试高、中、低浓度各24份，用其标准差/平均值×100%，即为其变异系数值。

表34. 批内批间



3.3.3 室间验证

对试剂盒进行不同实验室间测定结果的比较（表35）。测试高、中、低浓度各24份，用其标准差/平均值×100%，即为其变异系数值。三间实验室检测的结果变异系数均小于10%。

表35. 室间验证

|  |  |  |  |  |
| --- | --- | --- | --- | --- |
| 标曲浓度(ng/mL) | 室1 | 室2 | 室3 | CV% |
| 100 | 3.8286 | 3.5418 | 3.5727 | 4.316 |
| 50 | 2.3923 | 2.3439 | 2.5370 | 4.144 |
| 25 | 1.4822 | 1.5519 | 1.5407 | 2.455 |
| 12.5 | 0.9059 | 0.8788 | 1.0151 | 7.731 |
| 6.25 | 0.5454 | 0.5187 | 0.5899 | 6.524 |
| 3.13 | 0.3616 | 0.3659 | 0.3982 | 5.332 |
| 1.56 | 0.2788 | 0.2722 | 0.2933 | 3.835 |
| 0 | 0.1615 | 0.1697 | 0.1925 | 9.202 |

3.3.4 加标回收率检测

在准确称量的1 g蜂王浆样品中添加不同浓度的MRJP4对照品，按标准中规定步骤进行操作，测定蜂王浆中MRJP4的含量，按公式（1）计算加标回收率，结果见表36。

加标回收率 =〮〮〮〮〮〮（1）

式中：

C——测定样品中待测物质的浓度；

D——加入标准物质后测定样品中待测物质的浓度；

E——定量加入待测物质的理论浓度；

表36. 添加浓度及回收率

|  |  |
| --- | --- |
| 添加水平（mg/kg） | 回收率 |
| 50 | 80.3% ~ 105.4% |
| 100 | 86.7% ~ 99.2% |
| 200 | 90.6% ~ 100.5% |
| 500 | 75.6% ~ 110.1% |

3.4 MRJP4 ELISA试剂盒的产品性能评价总结

1. 检测范围：1.563-100 ng/mL。

2. 灵敏度或试剂盒检出限（LOD）：6.57 mg/kg。

3. 定量限（LOQ）：62.5 mg/kg。

4. 精密度：批内差CV%<8%，批间差CV%<10%。

5. 特异性：本试剂盒特异性检测MRJP4，且与其他相关蛋白无交叉反应。

6. 稳定性测试合格。

7. 热破坏稳定性测试合格。

# 三、试验验证的分析报告及技术经济论证

## （一）实验验证的分析

本方法分别在三家具备资质的实验室进行重现验证试验，三家实验室分别为农业农村部奶及奶制品监督检验测试中心（北京）（实验室编号Lab1）、农业农村部蔬菜品质监督检验测试中心（北京）（实验室编号Lab2）、秦皇岛海关技术中心（实验室编号Lab3）。分别选择新鲜蜂王浆样品添加高中低三个浓度水平进行重现验证试验，每个浓度水平进行3次重复试验，测得MRJP4的回收率。将三家比对的结果汇总于表37、表38、表39，结果显示本方法具有良好的重现性。

表37. 三家单位标准曲线范围

|  |  |  |
| --- | --- | --- |
|  | 标准曲线回归方程 | 相关系数（R2） |
| Lab1 | y = -0.0002x2 + 0.0525x + 0.1928 | R² = 0.9995 |
| Lab2 | y = -0.0003x2 + 0.0602x + 0.22 | R² = 0.9991 |
| Lab3 | y = -65.751x2 + 172.01x - 11.747 | R² = 0.9969 |

表38. 三家单位蜂王浆样品测定结果

|  |  |  |  |  |
| --- | --- | --- | --- | --- |
| 平均值  （mg/kg） | Lab1 | Lab2 | Lab3 | 变异系数  （CV%） |
| S1 | 47.57 | 47.78 | 44.19 | 4.33 |
| S2 | 29.42 | 28.35 | 29.16 | 1.93 |
| S3 | 859.70 | 734.26 | 888.61 | 9.92 |
| S4 | 119.77 | 119.37 | 126.88 | 3.46 |
| S5 | 849.53 | 878.95 | 878.58 | 1.94 |
| S6 | 318.19 | 322.80 | 310.58 | 1.95 |

表39. 三家单位蜂王浆本底及加标回收率测定结果

|  |  |  |  |  |
| --- | --- | --- | --- | --- |
| 回收率（%）  添加量  （mg/kg） | Lab1 | Lab2 | Lab3 | 变异系数  （CV%） |
| 50 | 93.8 | 96.68 | 90.27 | 3.43 |
| 100 | 101.7 | 102.63 | 97.58 | 2.67 |
| 200 | 97.0 | 98.93 | 110.36 | 7.07 |

## （二）预期的经济效益、社会效益和生态效益

我国是世界上蜂王浆第一生产国，也是第一出口国。而蜂王浆在国内市场的销售价格大约为100-200元/斤，几乎是十年未变。近年来，我国蜂王浆的年产量逐年降低，目前，我国每年蜂王浆产量仅有3000多吨；而我国2022 年蜂王浆出口数量620.20吨，同比下降12.48%；蜂王浆冻干粉出口184.75 吨，同比下降21.04%；而其它种类的蜂产品，例如蜂蜜、蜂花粉和蜂胶的出口数量均是同比上涨的。销售价格低迷是损害蜂王浆产业的最重要因素。

从本次调查的检测结果来看，蜂王浆的品质是存在一定差异的，其新鲜度影响了其生物学活性，因而，如何评价蜂王浆的新鲜度和品质是实现优质优价、保护蜂王浆优质高效生产和优化蜂王浆市场的关键。通过本标准的应用，将蜂王浆按等级进行区分，3000吨蜂王浆大约1/3为优等品，而优等品的销售价格提高50元/斤，市场销售额可以增加大约1亿元，而消费者也能通过科学的检测指标来进行商品购买，这对于蜂农、蜂王浆收购和销售公司以及消费市场来说均是一个利好刺激。

# 四、与国际、国外同类标准技术内容的对比情况

本标准的制定过程中所推荐的检测方法均来自我们国家现行的标准方法，未涉及国际标准方法，无需开展相关试验验证对比工作。在资料查阅过程中，与国际同类标准对比，本标准中涉及的检测方法与国际标准采用方法一致。本标准没有采用国际标准。

# 五、与有关现行法律、法规和强制性标准的关系

在标准的制定过程中严格贯彻国家有关方针、政策、法律和规章等，严格执行强制性国家标准和行业标准。与相关的各种基础标准相衔接，遵循了政策性和协调同一性的原则。

本标准在编写过程中严格遵守现行各种法规，其编写格式按GB/T 1.1-2020《标准化工作导则第1部分：标准结构和编写规则》执行。

# 六、重大分歧意见的处理经过和依据

本标准在编制过程中没有重大意见分歧。

# 七、涉及专利的有关说明

未识别到与本文件技术内容有关的专利。

# 八、贯彻标准的要求和措施建议

标准发布后，建议相关的管理部门及时组织检验人员进行交流和培训，通过现场会和培训会加强相关专业人员对标准的了解和认识；通过实地指导和发放技术手册等形式，提高人员检测技术水平；并开展蜂王浆产品中MRJP4含量的调查和监测，进一步提高我国蜂产品质量安全水平，确保广大消费者食品安全。

# 九、废止现行有关标准的建议

本标准为新制定发布标准，没有涉及相关现行有关标准废止问题。

# 十、其他应予说明的事项

无其他应予说明的事项。

**《蜂王浆中蜂王浆主蛋白4的测定酶联免疫吸附法》标准编制组**

**二零二三年五月**

**编制说明 附件1**

**抗原的制备和纯化**

**1. 小量表达**

1）将测序鉴定正确的重组质粒转化表达宿主。

2）挑取含重组质粒的单菌落至3 mL LB（含抗生素）中37 ℃过夜培养。

3）取30 µL过夜培养菌液加入到含3 mL LB培养基中，37 ℃震荡培养至OD600约0.6；剩余的过夜培养液添加甘油到20%置于-80 ℃，作为工作种子备用。

4）取部分液体作为未诱导的对照组，余下的加入IPTG诱导剂至终浓度0.5 mM作为实验组，两组继续37 ℃震荡培养3 h。

5）取菌体1 mL，离心12000 g×30 s收获沉淀，用100 μL 1%SDS重悬，混匀，100 ℃ 10 min。 12000 g离心10 min，取上清进行SDS-PAGE检测分析。

**2. 蛋白表达与破菌检测**

1）取保存于-80 ℃的菌种20 µL转接入20 mL液体LB培养基（含相应抗生素）。

2）取2 mL过夜培养菌液加入到含2000 mL LB培养基中，37 ℃震荡培养至OD600约0.6，降低温度到30 ℃。

3）加入IPTG诱导剂至终浓度0.5 mM作为实验组，30 ℃继续震荡培养3 h。

4）收集发酵液，6000 g离心10 min收集菌体。将菌体悬浮于40 mL预冷的NTA-0（Tris-HCl 20 mmol/L(pH 7.9)，NaCl 0.5mol/L，甘油10%）缓冲液中。

5）冰浴超声波破碎细菌，控制功率为300 W，超声4 s，暂停4 s，超声90次。

6）20000 g，4 ℃离心30 min，收集上清以及沉淀。

7）取少量样品进行SDS-PAGE检测；剩余上清及沉淀至于0-7 ℃备用。

3. **蛋白纯化**

1）将Ni-NTA树脂装入合适的层析柱，用 10 倍柱床体积的NTA-0 Buffer冲洗。

2）将样品加到层析柱中，流速控制在0.5 mL/min左右，收集穿透部分。

3）层析用10倍柱床体积的NTA-0 Buffer 冲洗，流速控制在1 mL/min左右。

4）分别用10倍柱床体积的NTA-20，NTA-60，NTA-200，NTA-500 Buffer洗脱（注：NTA-20、NTA-60、NTA-200、NTA-500溶液分别为*NTA-0溶液*含咪唑20mmol/L、60mmol/L、200mmol/L、500 mmol/L ），流速控制在1 mL/min左右，收集各洗脱峰。

5）纯度达到要求的组分，至于透析带中，4 ℃以1×PBS透析（换液2次）。

6）4 ℃超滤浓缩透析产物。

**抗体的制备**

**（一）、小鼠免疫及血清效价评价**

1. 免疫Balb/c小鼠，8周左右成年雌性，抗原与等体积完全佐剂（首免）和不完全佐剂（加强免疫）混合并进行乳化，充分混合至油包水状态进行皮下多点免疫，2-3次加强免疫，每次免疫间隔周期2周，之后进行效价检测，高于>1:50000后1周内进行腹腔冲击，直接将免疫剂量的抗原溶于PBS中。

2. 免疫后效价检测方法：

间接法检测血清效价，具体方法如下：

1）包被：将抗原按1 µg/mL浓度包被96孔板每孔50 µL， 37 ℃ 2 h或4 ℃过夜；

2）封闭：2% BSA或者5%的脱脂牛奶封闭液200 µL/孔，37 ℃ 1 h或4 ℃过夜，TBST洗4遍；

3）一抗：加入抗血清，用样稀将血清按 1:1000，1:2000，1:4000，1:8000，1:16000，1:32000，1:64000，1:128000依次进行倍比稀释；

4）37 ℃温育1 h后洗板4次，加二抗，用酶稀按1:10000稀释Jackson二抗，100 µL/孔，37 ℃温育1 h；

5）洗板4次后显色：加底物溶液100 µL/孔，37 ℃恒温箱放置5～10 min；

6）终止反应、比色：加30 µL/孔终止液，颜色变黄；用酶标仪测定450 nm的吸光值。

**（二）、细胞融合**

末次冲击3天后，摘除眼球处死，并收集阳性对照血，取出脾脏，制备成单细胞悬液，然后取出处于对数期的SP2/0细胞处理后，与脾细胞以一定比例混合（1:5-1:10），50% PEG1450作用1 min，以基础培养基DMEM稀释终止，低速离心后，再用含20%胎牛血清的HAT培养基轻轻悬浮并混匀，按照2×107/板铺至预先准备好的饲养层细胞板里，置于5% CO2，37 ℃下培养。具体步骤如下：

1）脾细胞：小鼠解剖取出免疫好的脾脏，并分离脾脏中的淋巴细胞；

A. 在超净工作台中准备一个1.5 mL EP管，加入1 mL无血清培养基，两个3.5 cm 培养皿，加入2 mL无血清培养基，两支15 mL离心管，其中一支加入10 mL无血清培养基，手术器械（高压湿热灭菌），绢网，移液器（1 mL），枪头。

B. 取已经免疫的BALB/c小鼠，摘除眼球采血，并分离血清作为抗体检测时的阳性对照血清。同时通过断颈处死小鼠，浸泡于75%酒精中5 min，放蜡盘上固定后剪开脾脏上皮肤，用镊子取出脾脏，放在1.5 mL 离心管中。

C. 将脾脏转移到超净台里的其中一个3.5 cm 培养皿中，摘除脾脏上面的脂肪和结缔组织，洗一遍，铺开一张绢网放在培养皿盖子上，将脾脏轻轻挤破，放在绢网中间位置。将绢网两次对折，用移液器吸取无血清培养基轻轻吹散，用研磨棒研磨，使脾脏内淋巴细胞透过绢网制成单细胞悬液，收集单细胞悬液于15 mL离心管中，1000 rpm离心5 min。

2）SP2/0准备：取瘤分离制备单细胞悬液后，1000 rpm，离心5 min后弃掉上清，10-20 mL DMEM（根据瘤子大小而定）重悬并混匀，利用淋巴细胞分离液进行分离，其与DMEM体积比为1:1，缓慢滴加分离液于重悬的细胞中，然后2500 rpm，离心15 min，后小心放置到超净工作台上，用移液枪将中间一层乳白色的晕圈转移至新的离心管中（事先准备好30 mL DMEM于管中），1000 rpm，离心5 min，最后弃掉上清，收集细胞于10 cm培养皿中，用10%的胎牛血清调整状态并扩大培养，通常一只小鼠的瘤子当天可制备3-5皿，第二天离心扩大到30皿，然后冻存30-35管。

准备融合时，按下列步骤进行：

A.第一天复苏；

B.第二天根据融合的数量传代，5皿/1个融合；

C.约两天后观察细胞状态，是否达到对数期，然后收集细胞准备融合；

3）饲养层细胞准备：将健康的Balb/c小鼠在无菌条件下取出其脾脏，并用含20%胎牛血清的HAT培养基制成单个脾细胞悬液，然后根据铺板数量，预先将其铺入到96孔板中。

4）终止液：基础培养基DMEM 20 mL预先放入37 ℃水浴锅中孵育。

**（三）、细胞建株**

**1. 融合板检测**

待融合板换液细胞长至中等大小约1万个细胞以上开始检测（检测方法为ELISA方法）在ELISA质控合格（即阴性对照<0.2，阳性对照>1.0）后挑选阳性孔（一般OD450≥0.5）作亚克隆。

**1）检测方法**：效价检测-间接ELSIA

（1）抗原包被：用包被液稀释抗原到 1 µg/mL，100 μL/孔加入聚苯乙烯 96 孔反应板中，4 ℃放置过夜。

（2）洗涤：次日弃掉孔内的液体，洗涤液洗 3 次。

（3）封闭：加 l50 μL/孔封闭液，室温放置 0.5 h。

（4）洗涤：用洗涤液洗 3 次。

（5） 加待测样品(一抗)：细胞培养上清原液，其中抗血清做阳性对照，空白血清做阴性对照，稀释好之后均每孔100 µL，37℃温育1h。

（6） 洗涤：用洗涤液洗 3 次。

（7） 加酶标抗抗体：加入 HRP标记羊抗鼠IgG（1:10000，酶稀稀释），100 µL/孔，37 ℃孵育40 min。

（8） 洗涤：用洗涤液洗 5 次，蒸馏水洗 2 次。

（9） 显色：加新鲜配制的底物溶液 100 μL/孔，室温暗处放置 5-30 min

（10）终止反应、比色：加 50 μL/孔终止液。颜色变黄；用酶标仪测定 450 nm处各孔的吸光值。

**2）细胞融合检测结果**

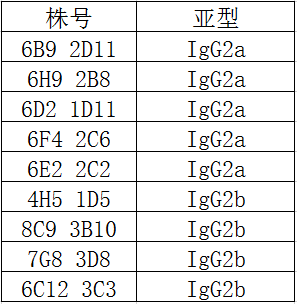
进行半固体和液体融合共12板，一共获得阳性细胞株64株；其中效价值OD>2.0的有50株；OD在1.0-2.0之间的有14株。

**2. 亚克隆方法及检测**

从结果挑出融合板中检测阳性值高的孔进行有限稀释，以每板60%的单克隆孔数量计数做亚克隆，每次均挑取阳性值较高的单克隆孔进行有限稀释，每次亚克隆5-7天即可进行ELISA检测，直到最终筛选出能稳定分泌阳性抗体的单克隆细胞株进行扩大培养。

MRJP4阳性较多，融合检测后筛选出52株阳性，挑选其中的14株进行一亚，一亚检测后筛选出11株二亚，二亚检测后挑选阳性克隆9株进行扩大，经过三轮的亚克隆，最终定株杂交瘤细胞株9株（表1），挑选了其中亲和力较高的1株制备抗体，进行后续抗体表位检测和配对实验。

表1. 定株杂交瘤细胞株9株



**3. 株细胞株定株及亚型鉴定**

将亚克隆阶段筛选出的稳定分泌阳性抗体的细胞株，扩大培养于24孔板，扩大后收集上清进行抗原检测，采用ELISA梯度稀释及WB验证其稳定性，收集细胞扩大于10 cm培养皿中，再次收集上清并检测其中抗体的效价，挑选出较高的1-3株细胞株培养于细胞瓶中，进行冻存。

**4. 细胞株冻存鉴定**

在细胞株冻存完毕后必须复苏同一批次中的一支进行鉴定，鉴定标准：①复苏活细胞数≥100万个细胞/支；②活细胞中有活力细胞≥50万/株；③复苏细胞中不能有除细胞株细胞以外的其它微生物(如:细菌.真菌.支原体等)出现；④复苏细胞生长到一定数目后选出生长好的细胞作单克隆计数铺板，并检测单克隆的分泌抗体能力是否全阳或有抗体分泌；⑤细胞培养上清也需作ELISA，以确定是否分泌阳性抗体的同时做western-boltting的鉴定。

**5. 腹水制备**

制备腹水，先用降植烷或液体石蜡行小鼠腹腔注射，一周后将杂交瘤细胞接种到小鼠腹腔中。细胞定株后扩大培养选用10%胎牛血清培养基，当细胞密度达到以1×106-2×106/mL时，800 rpm离心，收集沉淀，并用PBS重悬后，腹腔注入到小鼠（液体石蜡）体内，7-10天后，收集腹水准备纯化。

**6.抗体纯化**

抗体纯化步骤见表2.

表2. 抗体纯化步骤



**（四）、抗体表位检测及抗体配对筛选**

具体步骤如下：

1）经过亲和力以及样本检测，选择8C9制备抗体，并标记生物素，摸索最佳的稀释比例；

2）包被：用CBS包被对应的抗原，浓度为1 µg/mL，100 µL/孔，37 ℃2小时或者4 ℃过夜；

3）封闭：5% PBS的脱脂奶粉或者2% PBS的BSA封闭，37 ℃1 h或者4 ℃过夜；

4）一抗：将标记的抗体和检测的抗体均按照方阵摸索的稀释度（1:1000和1:2000）稀释；阴性对照：50 µL标记抗体+50 µL自身抗体；阳性对照：50 µL标记抗体+50 µL无关抗体；

5）二抗：羊抗或者兔抗均可，100 µL/孔，37 ℃1 h；

6）底物：根据标记的酶选择合适的底物，100 µL/孔，10 min；

7）显色，终止，读数。

抗体表位检测结果见表3。

表3. 抗体表位检测结果

|  |  |
| --- | --- |
|  |  |
| **结论：由上述结果选择标记抗体的稀释比例为1/50000，进行接下来的阻断实验。** | **结论：从阻断实验结果分析，6H9 2B8与标记抗体为不同表位。** |

**双抗体夹心ELISA法的酶联免疫试剂盒的制备**

1. **基本效价检测-间接ELSIA法**

抗原包被：用包被液稀释抗原到 2 μg/mL，100 μL/孔加入聚苯乙烯 96 孔反应板中，4℃放置过夜；

洗涤：次日弃掉孔内的液体，洗涤液洗 3 次；

封闭：加 150 μL/孔封闭液，室温放置 0.5 h；

洗涤：用洗涤液洗 3 次；

加待测样品(一抗)：加入抗血清（取血 4℃过夜后 4, 000 rpm 离心10 min 得上清），用样稀将血清按 1:200，1:400，1:800，1:1600，1:3200，1:6400，1:12800......进行倍比稀释（空白血清做阴性对照），每孔 100 μL，温育 1 h；

洗涤：用洗涤液洗 3 次；

加酶标抗抗体：加入 HRP 标记羊抗鼠 IgG（1:5000，酶稀稀释），100 µL/孔，36 ℃孵育 40 min；

洗涤：用洗涤液洗 5 次，水洗 2 次；

显色：加新鲜配制的底物溶液 100 μL/孔，室温暗处放置 5～30 min；

终止反应、比色：加 50 μL/孔终止液。颜色变黄；用酶标仪测定 450 nm 处各孔的吸光值。

**2. 标准曲线图及标准曲线线性范围**

**1）抗体配对初筛**

具体步骤如下：

A包被：将待测的抗体2 µg/mL包被，37 ℃ 2 h或者4 ℃过夜；

B 封闭：2%BSA或者5%的脱脂牛奶封闭液200 µL/孔，37 ℃ 1 h或4 ℃过夜，TBST洗4遍；

C 标品及样本：标准品及样本按照图中备注信息添加到96孔中，50 µL/孔，37 ℃ 2 h；

D 二抗：生物素标记的抗体按照推荐的稀释比例加入96孔中，90 µL/孔，37 ℃1 h；

E 二二抗：HRP-avidin，目前使用浓度1：4000，90 µL/孔，37 ℃ 1 h；

F 底物：90 µL/孔，37 ℃放置5-15 min；

G 终止反应、比色：加30 µL/孔终止液，颜色变黄；用酶标仪测定450 nm的吸光值。

**2）标准曲线设置**

标准曲线的设置原则以样本检出浓度为基准，即此曲线需包含各样本的检出浓度范围。固定标准品的浓度，选取不同的包检、检抗及二抗的浓度进行棋盘滴定实验，以此选取各个参数合适的浓度条件。

具体步骤如下：

1）包被：将待测的抗体按照图中标注的1 µg/mL、2 µg/mL、4 µg/mL分别包被，37 ℃ 2 h或者4 ℃过夜；

2）封闭：2%BSA或者5%的脱脂牛奶封闭液200 µL/孔，37 ℃1 h或4 ℃过夜，TBST洗4遍；

3）重组蛋白为标准品：标准品设置S7和S0添加到96孔中，50 µL/孔，37 ℃ 2 h；

4）二抗：生物素标记的抗体按照推荐的稀释比例加入96孔中，90 µL/孔，37 ℃ 1 h；

5）二二抗：HRP-avidin，目前使用浓度1：4000，90 µL/孔，37 ℃ 1 h；

6）底物：90 µL/孔，37 ℃放置5-15 min；

7）终止反应、比色：加30 µL/孔终止液，颜色变黄；用酶标仪测定450 nm的吸光值。

**3）标准曲线调整**

适当调整包抗、检抗及HRP的浓度来优化标准曲线，确保标曲R2≥0.99视为合格。测试不同稀释比的样本，OD值随稀释比例的降低呈线性下降，符合预期；改变标品形态，测试稳定性。

从标曲线性来看，1ug/ml包被，1:3000检的条件更合适。

**3. 样品的检测及评价方法的建立**

样本前处理

A．根据样本类型提前处理样本；

B. 测试中均设置复孔；

C. 对于个别含量较高的项目，需要稀释后梯度测试样本。

**4. ELISA方法的考核评估**

**1) 稳定性**

A. 稳定性测试

含4天及7天的稳定性，测试方法如下：分别将包被板（已包被抗体）、标准品（冻干粉）、中间浓度检抗各2套放置于37 ℃培养箱，于4天后取出一套，7天后取出一套；7天后将放热破的2套原料与4 ℃放置的原料一起做标曲的比较，计算OD值的下降率。

B. 评判标准

37 ℃培养箱热破7天后，下降率≤30%即视为稳定性合格。

热稳定性7天下降均＜30%，热稳合格，进入下一步批内批间！

**2）批内批间差**

A. 批内变异系数：要求≤8%，方法：测试高、中、低浓度各24份，用其标准差/平均值×100%，即为其变异系数值。

B. 批间变异系数：要求≤10%，方法：测试高、中、低浓度各24份，用其标准差/平均值×100%，即为其变异系数值。

**3）最低检测限**

一般满足在标曲最低端浓度的二分之一。公式：20份空白样品测定均值加上2倍标准差。

**4）样本采集及保存**

1. 血清：全血标本请于室温放置2 h或4 °C过夜后于2 °C -8 °C 1000×g离心15 min，取上清即可立即检测；或进行分装，并将标本放于-20 °C或-80 °C保存，但应避免反复冻融；解冻后的样品应再次离心，然后检测。

2. 血浆：可用EDTA或肝素作为抗凝剂，标本采集后30 min内于2 °C - 8 °C 1000×g离心15 min，取上清即可立即检测或进行分装，并将标本放于-20 °C或-80 °C保存，但应避免反复冻融；解冻后的样品应再次离心，然后检测。

3. 细胞培养物上清：标本于2 -8 °C 1000×g离心15 min取上清，上清立即用于实验或分装后于-20 °C或-80 °C保存，避免反复冻融。

4. 尿液：用无菌管收集尿液于2 °C - 8°C， 1000×g离心15 min取上清，上清立即用于实验或分装后于-20 °C或-80 °C保存；避免反复冻融。试验前再次离心，以去除在样本保存期间可能出现的一些沉淀。

5. 组织裂解液：取100 mg组织，用1×PBS洗去血污。剪成小块放入组织研磨器（匀浆管）中，加入1 mL 1×PBS，制成匀浆，然后置于-20 °C过夜。经过反复冻融2次处理破坏细胞膜后，将组织匀浆于2 -8 °C 5000×g离心5 min取上清。取适量上清液立即进行实验，或将上清分装保存于-20°C或-80°C。解冻后的样品应再次离心，然后检测；避免反复冻融。

6. 蜂王浆原液处理办法：样本加入3倍体积PBS稀释，充分震荡后，超声20次，于10,000×g离心15 min，取上清。因样本粘稠度较高，推荐1:200倍稀释，混匀后立即用于实验或分装后于-20 °C或-80 °C保存。避免反复冻融。

注：标本溶血会影响最后检测结果，因此溶血标本不宜进行此项检测。

**5）试剂配制**

【标准品】

（1）从试剂盒中取出一支标准品，于6000-10000 rpm离心30 s。用1 mL样本稀释液溶解，并用枪头对准冻存管底部反复吸打5次以助溶解，充分混匀得到标准品S7，放置备用。

（2）取7个1.5 mL 离心管(S0-S6)依次排列，各加入250 µL样本稀释液，吸取250 µL标准品S7到第一个离心管中(S6)，轻轻吹打混匀。从S6中吸取250 µL到第二个EP管中(S5)，轻轻吹打混匀，以此类推进行标准品的倍比稀释，S0为样本稀释液（表4）。

表4. 标准品浓度

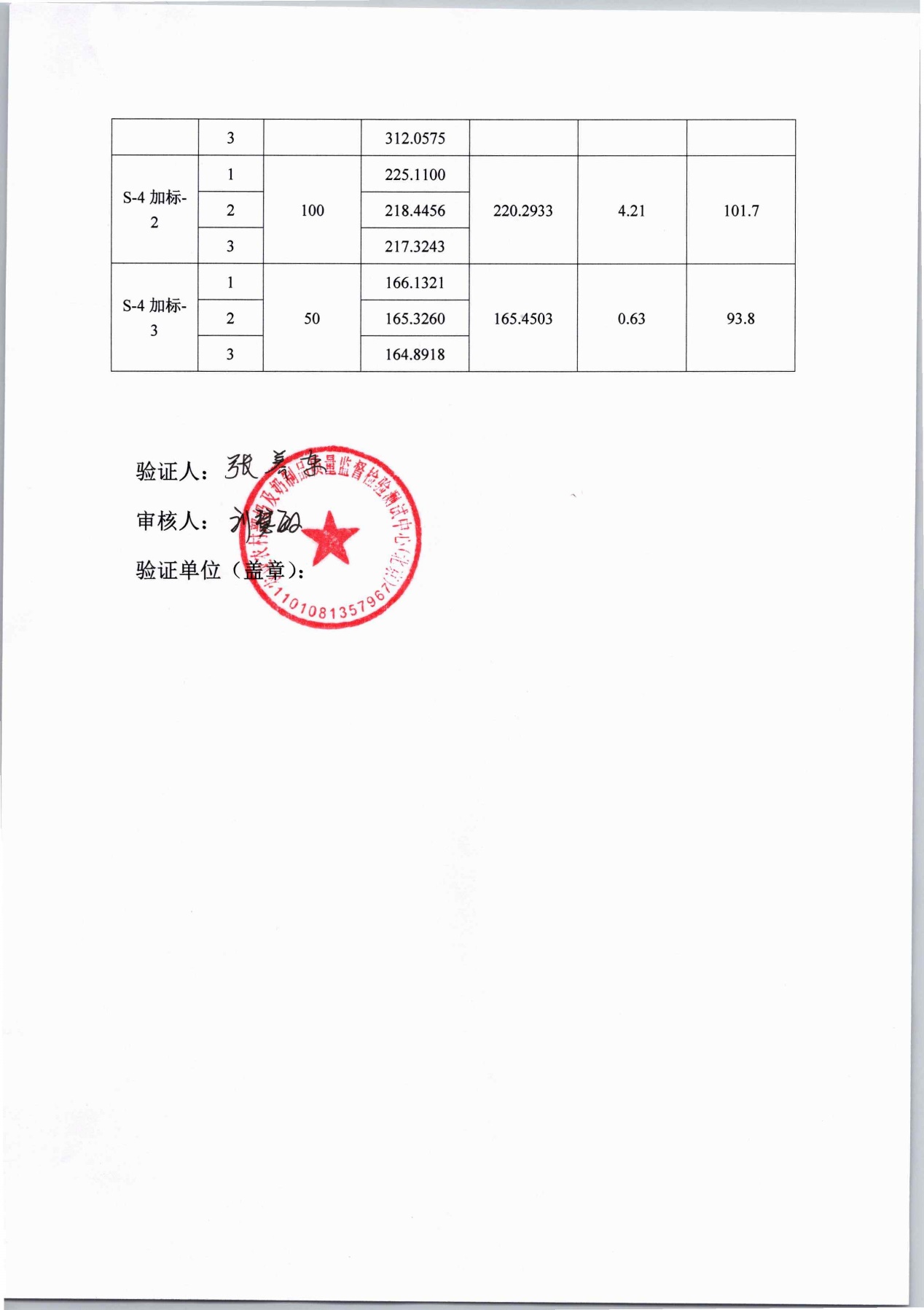
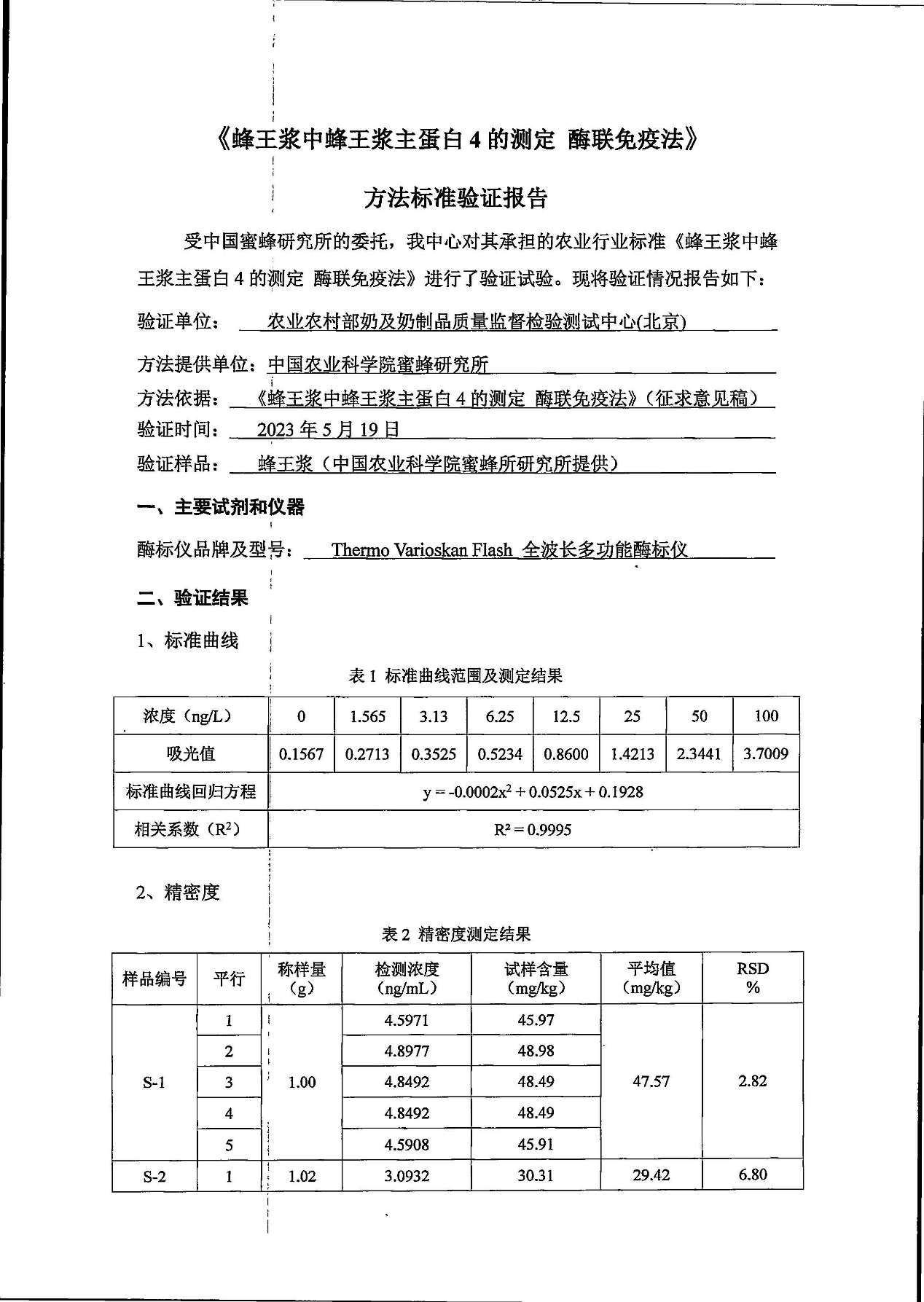
|  |  |  |  |  |  |  |  |  |
| --- | --- | --- | --- | --- | --- | --- | --- | --- |
| 编号 | S7 | S6 | S5 | S4 | S3 | S2 | S1 | S0 |
| ng/ml | 100 | 50 | 25 | 12.5 | 6.25 | 3.125 | 1.5625 | 0 |

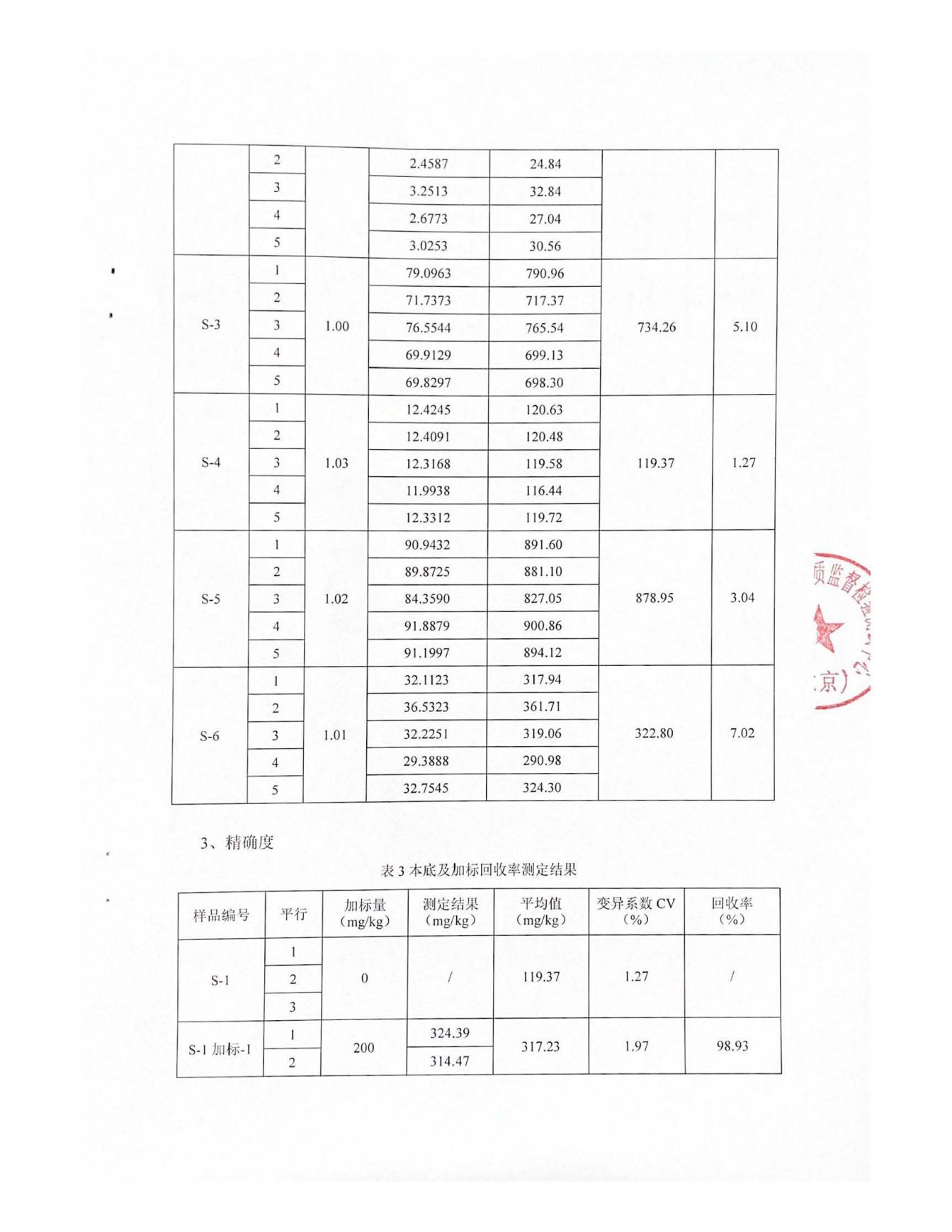
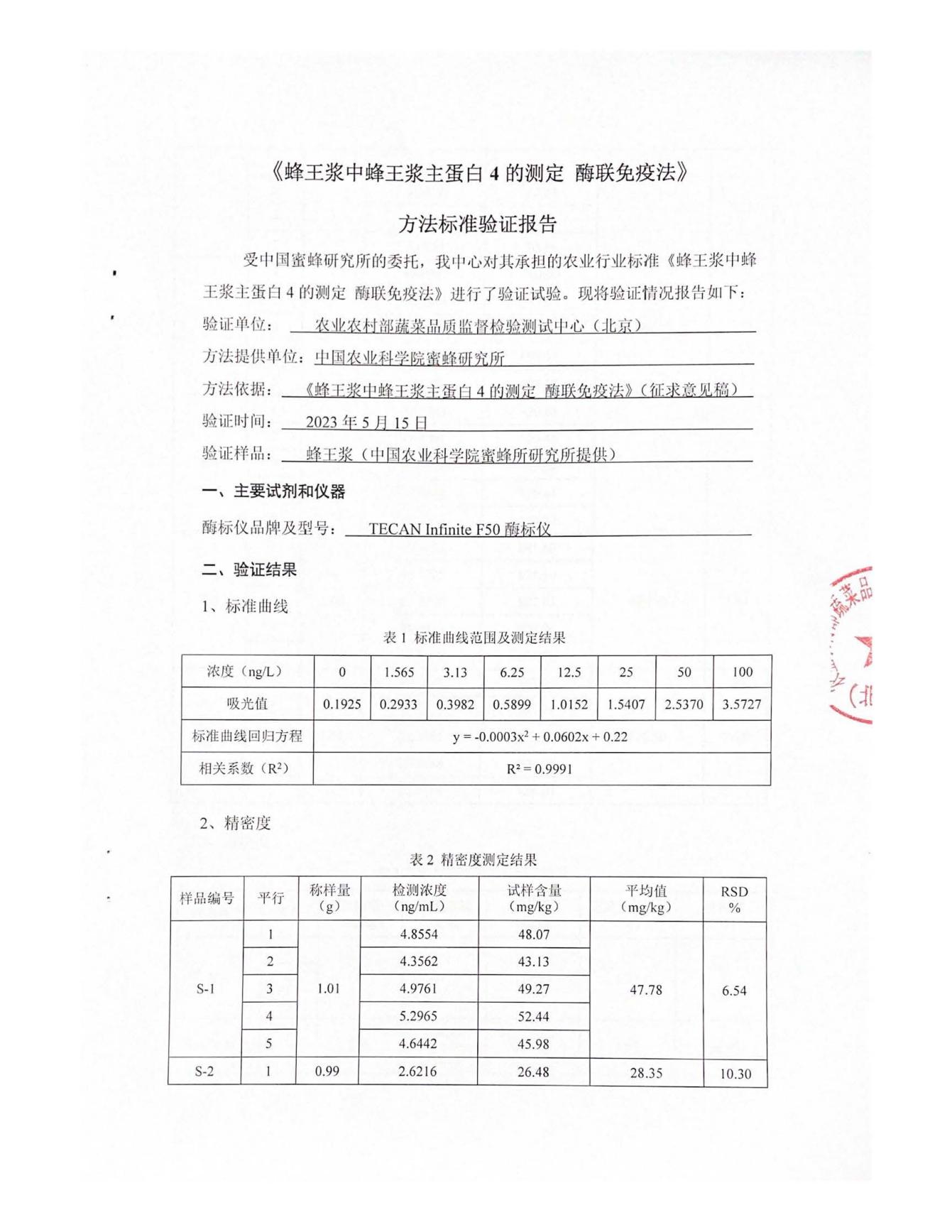
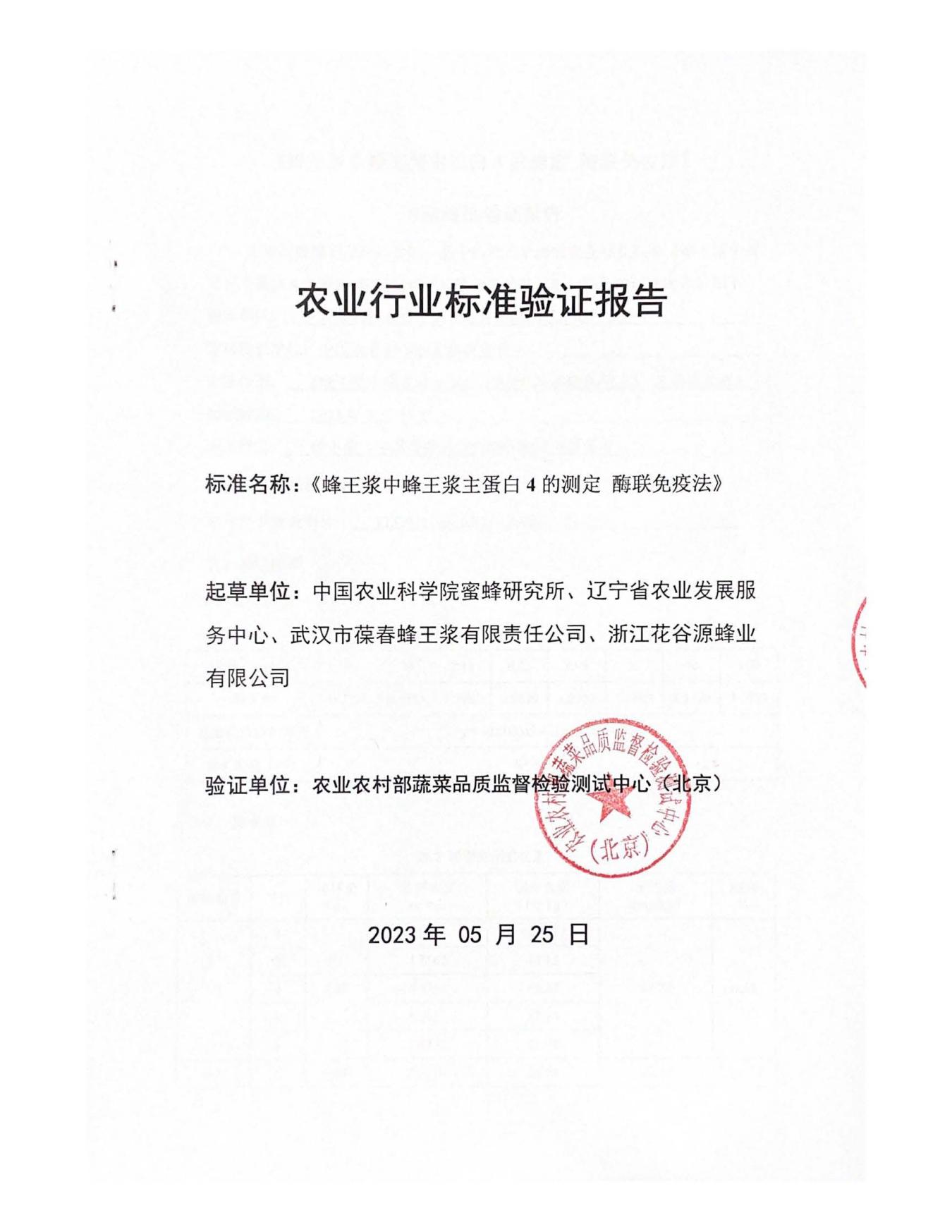
**洗液工作液** 浓洗涤液按1:25倍用去离子水进行稀释。例如用量筒量取240 mL去离子水，倒入烧杯或其他洁净容器中，再量取10 mL浓洗涤液，均匀加入，搅拌混匀，在临用前配妥。浓洗涤液低温保存会有盐析出，稀释时可在水浴中加温助溶。

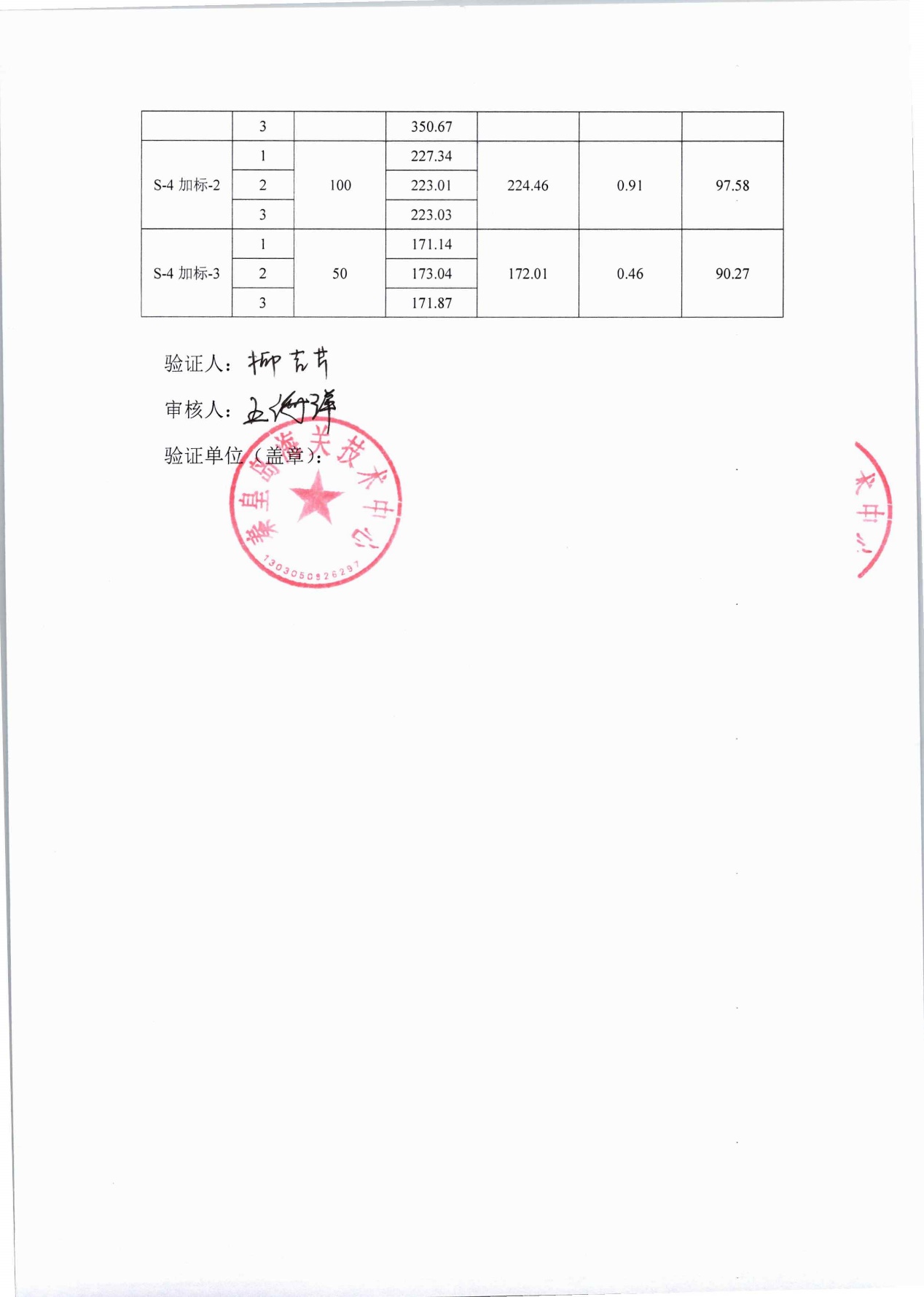
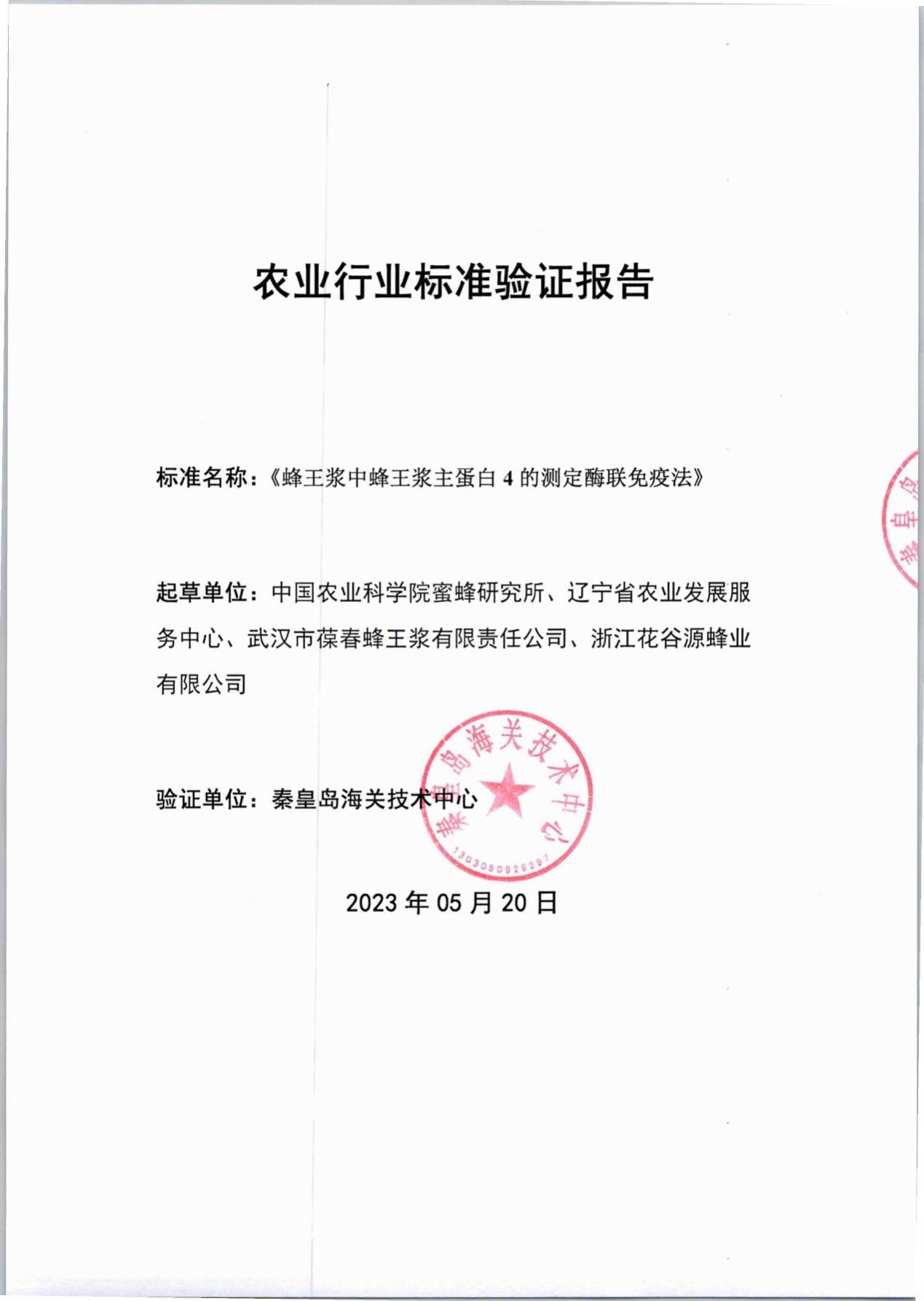
**生物素标记抗体工作液** 生物素标记抗体液按1:100倍用生物素标记抗体稀释液进行稀释。如10 μL生物素标记抗体加990 μL生物素标记抗体稀释液，轻轻混匀，在临用前10分钟内配妥。

**辣根过氧化物酶标记亲和素工作液** 辣根过氧化物酶标记亲和素按1:100倍用辣根过氧化物酶标记亲和素稀释液进行稀释。如10 μL辣根过氧化物酶标记亲和素加990 μL辣根过氧化物酶标记亲和素稀释液，轻轻混匀，在临用前10 min内配。

**编制说明 附件2 验证报告**

**Lab1**

**Lab2**

**Lab3**

**编制说明 附件3**

预审会议审查意见汇总处理表

标准名称：蜂王浆中蜂王浆主蛋白4的测定 酶联免疫吸附法 共 2 页

标准项目承担单位：中国农业科学院蜜蜂研究所等 2023年5月6日填写

|  |  |  |  |  |  |
| --- | --- | --- | --- | --- | --- |
| **序号** | **标准章条编号** | **意见内容** | **提出单位** | **处理意见** | **备注** |
| 1 | 1 | 增加“注：蜂王浆主蛋白4 是蜂王浆主蛋白之一，其含量能够反映蜂王浆新鲜度”。 | 专家组 | 采纳 |  |
| 2 | 2 | 删除GB/T 9697 | 专家组 | 采纳 |  |
| 3 | 2 | 应为“适用于本文件” | 专家组 | 采纳 |  |
| 4 | 3 | 删除3.1，修改为“没需要界定的术语和定义” | 专家组 | 采纳 |  |
| 5 | 5 | 5.2 改为“检测试剂盒及其试剂见附录A”，5.3 改为“按试剂盒说明书配制所需溶液” | 专家组 | 采纳 |  |
| 6 | 6.1 | 修改为“酶标仪：检测波长精度±2nm” | 专家组 | 采纳 |  |
| 7 | 7 | 修改为“蜂王浆200 g于密闭容器中，-18℃储存不超过2个月；蜂王浆冻干粉200 g于密闭容器中，4℃以下储存不超过2个月。” | 专家组 | 采纳 |  |
| 8 | 8.3 | 修改为“8.3 测定 按照检测试剂盒所述操作步骤对待测试样溶液进行测定。  8.4空白试验 空白试样采用水替代试样，按上述步骤进行测定。  8.5阳性质控 取任一试样，根据其蜂王浆主蛋白4的含量，选择一个合适的浓度进行添加，以确定试验过程的操作准确性。” | 专家组 | 采纳 |  |
| 9 | 8.5 | 修改为“8.6 标准曲线绘制  根据对照品质量浓度与吸光度变化关系绘制标准曲线，相关系数不低于0.99。试样溶液中蜂王浆主蛋白4的浓度应在标准曲线的线性范围内。如果试样中蜂王浆主蛋白4含量超出线性范围，则用样本稀释液稀释（*n*倍），重新测定。” | 专家组 | 采纳 |  |
| 10 | 附录A | 进一步规范 | 专家组 | 采纳 |  |
| 11 | 编制说明 | 完善定量限和检出限的确定过程，补充蜂王浆主蛋白4对照品的鉴定方法，以及抗体制备过程中细胞融合的具体步骤及结果。 | 专家组 | 采纳 |  |
| 12 | 验证报告 | 进一步完善验证报告 | 专家组 | 采纳 |  |

注:提出单位为专家组。