|  |  |
| --- | --- |
| ICS  | 65.140 |
| CCS  | B 47 |

中华人民共和国农业行业标准

NY/T XXXXX—XXXX

NY

蜂王浆中蜂王浆主蛋白4的测定 酶联免疫吸附法

Determination of major royal jelly protein 4 in royal jelly—Enzymelinked immunosorbent assay

（征求意见稿）

XXXX - XX - XX发布

XXXX - XX - XX实施

中华人民共和国农业农村部  发布

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。

本文件由中华人民共和国农业农村部畜牧兽医局提出。

本文件由全国畜牧业标准化技术委员会（SAC/TC 274）归口。

本文件起草单位：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)、浙江花谷源蜂业有限公司。

本文件主要起草人：XXXX。

蜂王浆中蜂王浆主蛋白4的测定 酶联免疫吸附法

* 1. 范围

本文件描述了蜂王浆中蜂王浆主蛋白4的酶联免疫吸附法。

本文件适用于蜂王浆及蜂王浆冻干粉中蜂王浆主蛋白4含量的测定。

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。

本文件方法的检出限为6.57 mg/kg，定量限为62.5 mg/kg。

* 1. 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

* 1. 术语和定义

本文件没有需要界定的术语和定义。

* 1. 原理

采用双抗体夹心酶联免疫吸附法测定蜂王浆主蛋白4的含量。蜂王浆主蛋白4的一对不同表位的鼠源单克隆抗体，与蜂王浆主蛋白4特异性结合，形成固相抗体-抗原-酶标抗体的免疫复合物，加底物显色后，在450 nm波长下测定吸光值，根据吸光值计算蜂王浆主蛋白4浓度，外标法定量。

* 1. 试剂或材料

除非另有说明，仅使用分析纯试剂。

5.1水：GB/T 6682，三级。

5.2检测试剂盒及其试剂见附录A。

5.3按试剂盒说明书配制所需溶液。

* 1. 仪器设备

6.1 酶标仪：检测波长精度±2 nm。

6.2 分析天平：精度为0.0001 g。

6.3 冷冻离心机：转速不低于12,000 r/min。

6.4 涡旋振荡器。

6.5 恒温培养箱：精度±1℃。

6.6 超声波清洗仪。

* 1. 样品

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。

* 1. 试验步骤

8.1提取

平行做两份试验。称取约1 g试样（精确至0.001 g）于50 mL离心管中，加水40 mL，室温下充分震荡20 min，或20℃以下超声10 min，转移至50 mL容量瓶中。离心管用少量水洗涤3次，洗液并入容量瓶中，并定容至50 mL，混匀。取适量溶液于4℃、12,000 r/min离心15 min，上清液备用。

8.2 稀释

8.2.1 蜂王浆

准确移取50 μL上清液（8.1）于10 mL容量瓶中，用水稀释定容至10 mL，混匀，为待测试样溶液。

8.2.2 蜂王浆冻干粉

准确移取25 μL上清液（8.1）于10 mL容量瓶中，用水稀释定容至10 mL，混匀，为待测试样溶液。

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。

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。

* 1. 试验数据处理

蜂王浆中蜂王浆主蛋白4的含量以质量分数*w*计，数值以毫克每千克（mg/kg）表示，按式（1）计算：

*X*=$\frac{C×V×n}{m×1000}......................（1）$

式中：

*C*——从标准工作曲线上得到的试样溶液中蜂王浆主蛋白4浓度，单位为纳克每毫升（ng/mL）；

*V*——试样液体积，单位为毫升（mL）；

*n*——试样液稀释倍数；

*m*——试样质量，单位为克（g）；

测定结果以平行测定的算术平均值表示，表示到小数点后两位。

* 1. 精密度

在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该算术平均值的 20％。

1.
2. （资料性）
蜂王浆主蛋白4测定试剂盒

A.1 包被好抗体的酶标板。

A.2 蜂王浆主蛋白4对照品（纯度 > 80%）。

A.3 样本稀释液。

A.4 生物素标记抗体。

A.5 生物素标记抗体稀释液。

A.6 辣根过氧化物酶标记亲和素。

A.7 辣根过氧化物酶标记亲和素稀释液。

A.8 浓洗涤液。

A.9 底物溶液。

A.10 终止液。

A.11 板贴。

