

ICS 67.080.10

CCS B50

T/GAIA

广东省分析测试协会团体标准

T/GAIA xxx—xxxx

水产品中河豚毒素的快速检测 胶体金免疫 层析法

Rapid detection of tetrodotoxin in aquatic products - Colloidal gold

immunochemical assay

(征求意见稿)

xxxx-xx-xx 发布

xxxx-xx-xx 实施

广东省分析测试协会

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。

本文件由广东省分析测试协会提出并归口。

本文件起草单位：华南农业大学、深圳市卓润生物科技有限公司、广州市轻工职业技术学校、海南省检验检测研究院食品检验检测中心、广州市轻工职业技术学校、广州万联生物科技有限公司、广州市增城区农产品推广与质量安全监督所、广州市从化区农产品质量安全监督检测中心、佛山市南海区农产品质量安全检测中心、广东省科学院测试分析研究所（中国广州分析测试中心）、广州分析测试中心科力技术开发公司

本文件主要起草人：徐振林、张赛、黄艳、李备、陈遂、雷红涛、魏静、尹青春、何健灵、徐杰伟、刘蕴欣、杨熙、江林峰、韩金治、陈伟妍、陈镜钦、邓永健、董家瑋、韦天才、钟鸣

水产品中河豚毒素的快速检测 胶体金免疫层析法

1 范围

本文件规定了水产品中河豚毒素的胶体金免疫层析快速检测方法。
本文件适用于河豚鱼、织纹螺、虾等水产品中的河豚毒素成分的快速筛查。

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。

GB5009.206—2016《食品安全国家标准 水产品中河豚毒素的测定》

GB/T 6682 实验室用水规格和试验方法

3 术语和定义

下列术语和定义适用于本文件。

3.1

检测线 test line

即T线，用于判断是否检测到了特定抗原或抗体。

3.2

质控线 control line

即C线，用于验证试剂的有效性。

4 原理

本方法采用竞争抑制免疫层析原理。样品中河豚毒素经提取后与胶体金标记的河豚毒素特异性抗体结合，抑制抗体和检测卡中检测线（T线）上河豚毒素抗原的结合，从而导致检测线颜色深浅的变化。通过检测线与质控线（C线）颜色深浅比较，对样品中河豚毒素进行定性判定。

5 试剂与材料

除非另有说明，本标准所用试剂均为分析纯，实验用水为GB/T 6682 规定的二级水。

5.1 试剂

5.1.1 乙酸（CH₃COOH）。

5.1.2 对甲苯磺酸（TsOH）。

5.2 试剂配制

- 5.2.1 样品提取液：称取 3 g 对甲苯磺酸粉末（5.1.2），加水充分溶解后，定容至 100 mL，混合均匀。
- 5.2.2 乙酸-水溶液（1+99）：量取 1 mL 乙酸（5.1.1），加水定容至 100 mL，混合均匀。
- 5.2.3 磷酸盐缓冲液：称取 8 g NaCl、0.2 g KCl、1.44 g 无水 Na₂HPO₄ 和 0.24 g 无水 KH₂PO₄，溶于 800 mL 水中，最后加水定容至 1000 mL。

5.3 标准物质

表1 标准物质信息

中文名称	英文名称	CAS登录号	分子式	相对分子质量
河豚毒素	Tetrodotoxin	4368-28-9	C ₁₁ H ₁₇ O ₈ N ₃	319

注：经国家认证并授予标准物质证书的标准物质。

5.4 标准溶液配制

- 5.4.1 河豚毒素标准储备液（1 mg/mL）：精密称取河豚毒素 10.0 mg，精确至 0.1 mg，用乙酸-水溶液（5.2.2）溶解，转移至 10 mL 容量瓶，再用乙酸水溶液（5.2.2）定容至刻度，配制成浓度为 1 mg/mL 的标准储备液。-20℃避光保存，有效期 1 年。
- 5.4.2 河豚毒素标准中间液（50 μg/mL）：移取河豚毒素标准储备液（5.3.1）500 μL 置于 10 mL 容量瓶中，用磷酸盐缓冲液（5.2.3）稀释至刻度，摇匀，配制成浓度为 50 μg/mL 的标准中间液。-20℃避光保存，有效期 3 个月。
- 5.4.3 河豚毒素标准工作液（1 μg/mL）：移取河豚毒素标准中间液（5.3.2）200 μL 置于 10 mL 容量瓶中，用磷酸盐缓冲液（5.2.3）稀释至刻度，摇匀，配制成浓度为 1 μg/mL 的标准工作液。-20℃避光保存，有效期 3 个月。

注：为避免毒素的危害，应戴手套进行操作。移液器吸头等用过的器材、废弃的提取液等应在氢氧化钠溶液（1 mol/L）中浸泡 1 h 以上，以使毒素分解。

5.5 空白试样

经参比方法（GB 5009.206—2016）检测不含河豚毒素的水产品。

5.6 材料

河豚毒素胶体金免疫层析试剂盒：一般包含胶体金试纸条、金标微孔及配套试剂。
 储存条件：室温、密封、避光、通风干燥保存，保质期 12 个月。

6 仪器与设备

- 6.1 天平：感量为 0.1 mg 和 0.01 g。
- 6.2 组织搅碎机。
- 6.3 涡旋混合器。
- 6.4 振荡器。
- 6.5 移液器：200 μL，1000 μL，5 mL。
- 6.6 离心机：转速 ≥ 4000 r/min。
- 6.7 胶体金读数仪（可选）

7 分析步骤

7.1 试样制备

河豚去皮去内脏，将肌肉部分用水清洗鱼体表面的污物，滤纸吸干鱼体表面的水分后用剪刀将鱼体分解成肌肉、肝脏、皮肤和性腺(精巢或卵巢)等部分，各部分组织分别用水洗去血污，滤纸吸干表面的水分后将各组织剪碎，充分均质；去除织纹螺体表面的泥浆及污物，打开螺壳，将其内容物剪碎，充分均质；虾去头和壳后进行取样，充分均质。装入清洁容器内，并标明标记。

7.2 试样提取

称取 2 g (精确到0.1 g) 匀浆试样于15 mL离心管中，加入2 mL磷酸盐缓冲液(5.2.3)，充分涡旋振荡，4000 r/min离心2 min。取200 μ L上清液于5 mL离心管中，加入400 μ L磷酸盐缓冲液(5.2.3)，涡旋混合30 s，作为待测液。

7.3 试样测定

取100 μ L样品待测液加入金标微孔中，充分混匀后室温孵育3 min，随后将微孔内的所有溶液吸出，加到试纸条的样品垫上，反应5 min后观察结果。

注：测定步骤建议按照试剂盒说明书。若无金标微孔，可直接取100 μ L待测液滴加至试纸条样品孔上。

7.4 质量控制

7.4.1 每批样品应同时进行空白试验和质控试验。

7.4.1.1 空白试验

准确吸取液体或称取固体空白试样，按照7.1、7.2和7.3步骤与试样同法操作。

7.4.1.2 质控试验

准确称取空白试样2 g (精确到0.1 g) 于15 mL离心管中，加入20 μ L标准工作液(5.4.3)，使河豚毒素标准物质浓度为10 μ g/kg，按照7.1、7.2和7.3步骤与试样同法操作。

7.4.2 空白试验测定结果应为阴性，加标质控试验测定结果应为阳性。

8 性能指标

8.1 性能指标计算方法按照附录 A 执行。

8.2 检出限：10 μ g/kg

8.3 灵敏度： $\geq 99\%$ 。

8.4 假阴性率： $\leq 1\%$ 。

8.5 假阳性率： $\leq 3\%$ 。

8.6 特异性： $\geq 97\%$ 。

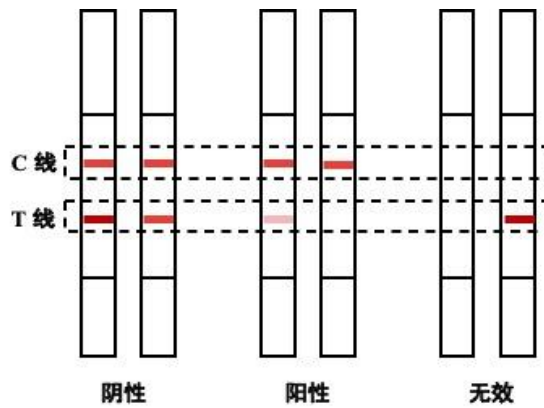
9 结果判定

通过对比C线和T线的颜色深浅进行结果判定，目视判定示意图见图1或2。结果判定也可根据产品说明书进行。

9.1 无效：C线不显色，表明不正确操作或试纸条/检测卡无效。

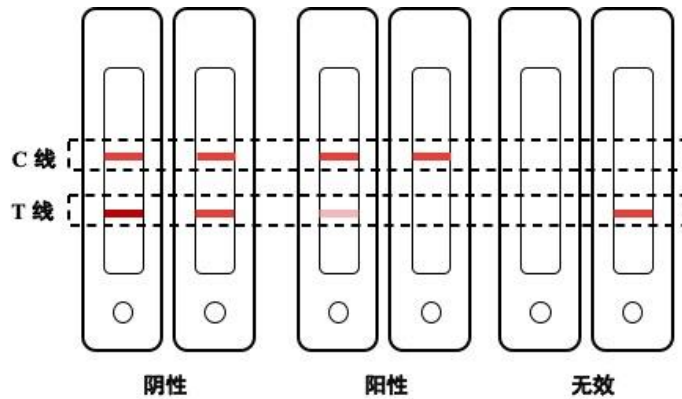
9.2 阴性结果：C线显色，T线颜色比C线颜色深或T线颜色与C线颜色相当，均表示样品中不含待测组分或含量低于方法检测限，判为阴性。

9.3 阳性结果：C线显色，T线颜色比C线颜色明显浅或T线不显色，均表示样品中待测组分含量高于方法检测限，判为阳性。



注：T线为检测线，C线为质控线。

图1 试纸条目视判定示意图



注：T线为检测线，C线为质控线。

图2 检测卡目视判定示意图

10 确证

当检测结果为阳性时，采用GB 5009.206—2016《食品安全国家标准 水产品中河豚毒素的测定》中第三法液相色谱-荧光检测法进行确证。

11 其他

本方法所述试剂、试剂盒信息及操作步骤是为给方法使用者提供方便，在使用本方法时不做限定。方法使用者在使用替代试剂、试剂盒或操作步骤前，须对其进行考察，应满足本方法规定的各项性能指标。

附录 A
(规范性)

快速检测方法性能指标计算表

快速检测方法性能指标计算方法见表A.1。

表 A.1 性能指标计算方法

样品情况 ^a	检测结果 ^b		总数
	阳性	阴性	
阳性	N11	N12	N1.=N11+N12
阴性	N21	N22	N2.=N21+N22
总数	N.1=N11+N12	N.2=N21+N22	N=N1.+N2.或 N.1+N.2
显著性差异(X ²)	$X^2=(N12-N21)^2/(N12+N21)$, 自由度 (df) =1		
灵敏度 (p+, %)	p+=N11/N1.		
假阴性率 (pf-, %)	pf- =N12/N1.=100-灵敏度		
假阳性率 (pf+, %)	pf+ =N21/N2.=100-特异性		
相对准确度, % ^c	$(N11+N22)/(N1.+N2.)$		
^a 由参比方法检验得到的结果或者样品中实际的公议值结果; ^b 由待确认方法检验得到的结果。灵敏度的计算使用确认后的结果。 N 任何特定单元的结果数, 第一个下标指行, 第二个下标指列。例如: N11 表示第一行, 第一列, N1.表示所有的第一行, N.2 表示所有的第二列; N12 表示第一行, 第二列。			