

中华人民共和国农业行业标准

NY/T 2070—2011

牛初乳及其制品中免疫球蛋白IgG的测定 分光光度法

Determination of immunoglobulin G in bovine colostrum and
its products—Spectrophotometry

2011-09-01 发布

2011-12-01 实施

中华人民共和国农业部 发布

前 言

本标准按照 GB/T 1.1—2009 给出的规则起草。

本标准由中华人民共和国农业部畜牧业司提出。

本标准由全国畜牧业标准化技术委员会(SAC/TC 274)归口。

本标准起草单位：中国农业科学院农业质量标准与检测技术研究所、东北农业大学。

本标准主要起草人：邵华、金茂俊、姜瞻梅、金芬、肖航、杨锚、王静、刘宁。

牛初乳及其制品中免疫球蛋白 IgG 的测定 分光光度法

1 范围

本标准规定了牛初乳及其制品中免疫球蛋白 IgG 的测定方法。
本标准适用于牛初乳及其制品中免疫球蛋白 IgG 的测定。
本方法检出限:0.2 mg/mL。

2 规范性引用文件

下列文件对于本文件的应用是必不可少的。凡是注日期的引用文件,仅注日期的版本适用于本文件。凡是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 分析实验用水规格和试验方法

3 原理

试样中可溶性抗原 IgG 与抗体形成可溶性免疫复合物,复合物在聚乙二醇作用下自液相析出,形成微粒,使试液浊度发生变化,试液浊度与所含 IgG 抗原量成正比,在 340 nm 测定免疫球蛋白 IgG 含量。

4 试剂与材料

除非另有说明,在分析中仅使用确认为分析纯的试剂。实验用水应符合 GB/T 6682 规定的二级水要求。

4.1 0.01 mol/L 磷酸盐缓冲液(pH 7.4)

取 0.27 g 磷酸二氢钾(KH_2PO_4),2.86 g 磷酸氢二钠($\text{Na}_2\text{HPO}_4 \cdot 12\text{H}_2\text{O}$),0.20 g 氯化钾(KCl),8.80 g 氯化钠(NaCl),水溶解后调 pH 至 7.4,用蒸馏水定容至 1 000 mL,置 4℃ 保存。

4.2 4%聚乙二醇缓冲液

取 40 g 聚乙二醇,加磷酸盐缓冲液(4.1)定容至 1 000 mL,置 4℃ 保存。

4.3 IgG 标准贮备液

称取 0.010 g IgG 标准品,精确至 0.000 1 g,用磷酸盐缓冲液(4.1)溶解并定容至 10.0 mL,摇匀。此标准贮备液质量浓度为 1.0 mg/mL,置-18℃ 保存备用。

4.4 IgG 标准系列溶液

取 IgG 标准贮备液,用 4%聚乙二醇缓冲液稀释(4.2),配制浓度为 0.20 mg/mL、0.30 mg/mL、0.40 mg/mL、0.50 mg/mL、0.60 mg/mL、0.70 mg/mL 和 0.80 mg/mL 的 IgG 标准系列溶液,临用时配制。

4.5 抗 IgG 抗体贮备液

取 10 mg 兔抗牛 IgG 抗体粉剂(效价 $\geq 10\,000$)溶于 2 mL 的磷酸盐缓冲液(4.1)中,每管分装成 100 μL ,置-18℃ 保存备用。

4.6 抗 IgG 抗体稀释液

取 100 μL 的抗体贮备液,加入 4.9 mL 的聚乙二醇缓冲液(4.2),将抗体稀释 50 倍。临用时配制。

5 仪器与设备

- 5.1 紫外分光光度计,340 nm,配有微量比色皿。
- 5.2 微量移液器。

5.3 反应管,0.5 mL。

5.4 冷冻离心机。

5.5 分析天平,感量 0.1 mg 和 0.01 g。

5.6 恒温水浴锅。

6 分析步骤

6.1 试样制备

6.1.1 液态牛初乳

取 2.0 mL 液态牛初乳试样于离心管中,在 1℃~5℃、5 000 r/min 条件下离心 30 min。去上层脂肪,取 1.0 mL 脱脂牛初乳试样,用 4%聚乙二醇缓冲液(4.2)稀释至 100 mL~200 mL,混匀,备用。

6.1.2 固态牛初乳

将固态牛初乳样品粉碎后,称取 0.2 g 试样,精确至 0.001 g,加 2.0 mL 水,混匀,在 1℃~5℃、5 000 r/min 条件下离心 30 min。去上层脂肪,取 1.0 mL 脱脂牛初乳试样,用 4%聚乙二醇缓冲液(4.2)稀释至 50 mL~100 mL,混匀,备用。

6.2 测定

6.2.1 标准曲线的绘制

向各个反应管中加入 250 μL 的抗 IgG 抗体稀释液(4.6),再分别取 10 μL 浓度为 0.20 mg/mL、0.30 mg/mL、0.40 mg/mL、0.50 mg/mL、0.60 mg/mL、0.70 mg/mL、0.80 mg/mL 的 IgG 标准系列溶液(4.4)依次加入各反应管中,混匀后,置于 37℃水浴中反应 40 min。以 4%聚乙二醇缓冲液(4.2)进行调零,在 340 nm 波长下测定吸光值,以标准溶液浓度为横坐标、吸光值为纵坐标,绘制标准曲线。

6.2.2 试样的测定

向各个反应管中加入 250 μL 的抗 IgG 抗体稀释液(4.6),再取 10 μL 待测试样加入各反应管中,混匀后,置于 37℃水浴中反应 40 min。以 4%聚乙二醇缓冲液(4.2)调整分光光度计的零点,在 340 nm 波长下,测定吸光值。根据标准曲线,计算待测试样中 IgG 含量。

6.3 空白实验

采用脱脂乳为空白样品,按照 6.1 和 6.2.2 的步骤进行操作。

7 结果计算

试样中 IgG 的含量以质量分数 ω 计,单位为克每百克(g/100 g)或克每百毫升(g/100 mL)表示,按式(1)计算:

$$\omega = \frac{\rho \times V \times 2 \times 100}{m \times 1000} \dots\dots\dots (1)$$

式中:

m ——试样的质量或体积,单位为克(g)或毫升(mL)。

ρ ——被测液中 IgG 的质量浓度,单位为毫克每毫升(mg/mL);

V ——试样稀释后的体积,单位为毫升(mL)。

计算结果保留两位有效数字。

8 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得超过算术平均值的 10%。