

中华人民共和国农业行业标准

NY/T 800—2004

生鲜牛乳中体细胞测定方法

Enumeration of somatic cells in raw milk

(ISO 13366—1:1997, Milk—Enumeration of somatic cells—Part 1:Microscopic method, ISO 13366—2:1997, Milk—Enumeration of somatic cells—Part 2: Electronic particle counter method, ISO 13366—3:1997, Milk—Enumeration of somatic cells—Part 3:Fluoro—opto—electronic method, MOD)

2004-04-16 发布

2004-06-01 实施

中华人民共和国农业部 发布

前 言

本标准修改采用 ISO 13366—1:1997《牛奶 体细胞测定方法 第一部分 显微镜法》、ISO 13366—2:1997《牛奶 体细胞测定方法 第二部分 电子粒子计数法》和 ISO 13366—3:1997《牛奶 体细胞测定方法 第三部分 荧光光电计数法》。

本标准由中华人民共和国农业部提出。

本标准起草单位:农业部乳品质量监督检验测试中心、农业部食品质量监督检验测试中心(上海)、农业部食品质量监督检验测试中心(佳木斯)和农业部食品质量监督检验测试中心(石河子)。

本标准主要起草人:王金华、张宗城、刘宁、孟序、陆静、张春林、王南云、罗小玲、程春芝。

生鲜牛乳中体细胞测定方法

1 范围

本标准规定了生鲜牛乳中体细胞的测定方法。

本标准适用于标准样、体细胞仪的校准以及生鲜牛乳中体细胞数的测定。

2 规范性引用文件

下列文件中的条款通过本标准的引用而成为本标准的条款。凡是注日期的引用文件,其随后所有的修改单(不包括勘误的内容)或修订版均不适用于本标准,然而,鼓励根据本标准达成协议的各方研究是否可使用这些文件的最新版本。凡是不注日期的引用文件,其最新版本适用于本标准。

GB 6682 分析实验室用水规格和试验方法

3 显微镜法

3.1 原理

将测试的生鲜牛乳涂抹在载玻片上成样膜,干燥、染色,显微镜下对细胞核可被亚甲基蓝清晰染色的细胞计数。

3.2 试剂

除非另有说明,在分析中仅使用化学纯和蒸馏水。

3.2.1 乙醇,95%。

3.2.2 四氯乙烷($C_2H_2Cl_4$)或三氯乙烷($C_2H_3Cl_3$)。

3.2.3 亚甲基蓝($C_{16}H_{18}ClN_3S \cdot 3H_2O$)。

3.2.4 冰醋酸(CH_3COOH)。

3.2.5 硼酸(H_3BO_3)。

3.3 仪器

3.3.1 显微镜:放大倍数 $\times 500$ 或 $\times 1\,000$,带刻度目镜、测微尺和机械台。

3.3.2 微量注射器:容量 0.01 mL。

3.3.3 载玻片:具有外槽圈定的范围,可采用血球计数板。

3.3.4 水浴锅:恒温 $65^\circ\text{C} \pm 5^\circ\text{C}$ 。

3.3.5 水浴锅:恒温 $35^\circ\text{C} \pm 5^\circ\text{C}$ 。

3.3.6 电炉:加热温度 $40^\circ\text{C} \pm 10^\circ\text{C}$ 。

3.3.7 砂芯漏斗:孔径 $\leq 10\ \mu\text{m}$ 。

3.3.8 干发型吹风机。

3.3.9 恒温箱:恒温 $40^\circ\text{C} \sim 45^\circ\text{C}$ 。

3.4 染色溶液制备

在 250 mL 三角瓶中加入 54.0 mL 乙醇(3.2.1)和 40.0 mL 四氯乙烷(3.2.2),摇匀;在 65°C 水浴锅(3.3.4)中加热 3 min,取出后加入 0.6 g 亚甲基蓝(3.2.3),仔细混匀;降温后,置入冰箱中冷却至 4°C ;取出后,加入 6.0 mL 冰醋酸(3.2.4),混匀后用砂芯漏斗(3.3.7)过滤;装入试剂瓶,常温贮存。

3.5 试样的制备

3.5.1 采集的生鲜牛乳应保存在 2℃~6℃ 条件下。若 6 h 内未测定,应加硼酸(3.2.5)防腐。硼酸在样品中的浓度不大于 0.6 g/100 mL,贮存温度 2℃~6℃,贮存时间不超过 24 h。

3.5.2 将生鲜牛乳样在 35℃ 水浴锅(3.3.5)中加热 5 min,摇匀后冷却至室温。

3.5.3 用乙醇(3.2.1)将载玻片(3.3.3)清洗后,用无尘镜头纸擦干,火焰烤干,冷却。

3.5.4 用无尘镜头纸擦净微量注射器(3.3.2)针头后抽取 0.01 mL 试样(3.5.2),用无尘镜头纸擦干微量注射器针头外残样。将试样平整地注射在有外围的载玻片(3.3.3)上,立刻置于恒温箱(3.3.9)中,水平放置 5 min,形成均匀厚度样膜。在电炉(3.3.6)上烤干,将载玻片上干燥样膜浸入染色溶液(3.4)中,计时 10 min,取出后凉干。若室内湿度大,则可用干发型吹风机(3.3.8)吹干;然后,将染色的样膜浸入水中洗去剩余的染色溶液,干燥后防尘保存。

3.6 测定

3.6.1 将载玻片固定在显微镜(3.3.1)的载物台上,用自然光或为增大透射光强度用电光源、聚光镜头、油浸高倍镜。

3.6.2 单向移动机械台对逐个视野中载玻片上染色体细胞计数,明显落在视野内或在视野内显示一半以上形体的体细胞被用于计数,计数的体细胞不得少于 400 个。

3.7 结果计算

样品中体细胞数按式(1)计算。

$$X = \frac{100 \times N \times S}{a \times d} \dots\dots\dots (1)$$

式中:

X —— 样品中体细胞数,单位为个每毫升(个/mL);

N —— 显微镜体细胞计数,单位为个;

S —— 样膜复盖面积,单位为平方毫米(mm²);

a —— 单向移动机械台进行镜下计数的长度,单位为毫米(mm);

d —— 显微镜视野直径,单位为毫米(mm)。

3.8 允许差

相对相差≤5%。

4 电子粒子计数体细胞仪法

4.1 原理

样品中加入甲醛溶液固定体细胞,加入乳化剂电解质混合液,将包含体细胞的脂肪球加热破碎,体细胞经过狭缝,由阻抗增值产生的电压脉冲数记录,读出体细胞数。

4.2 试剂

所有试剂均为分析纯试剂,实验用水应符合 GB 6682 中一级水的规格或相当纯度的水。

4.2.1 伊红 Y(C₂₀H₈Br₄O₅)。

4.2.2 甲醛溶液,35%~40%。

4.2.3 乙醇,95%。

4.2.4 曲拉通 X—100(Triton X—100)(C₃₄H₆₂O₁₁)。

4.2.5 0.09 g/L 氯化钠溶液:在 1 L 水中溶入 0.09 g 氯化钠。

4.2.6 硼酸(H₃BO₃)。

4.3 仪器

4.3.1 砂芯漏斗,孔径≤0.5 μm。

4.3.2 电子粒子计数体细胞仪。

4.3.3 水浴锅:恒温 $40^{\circ}\text{C} \pm 1^{\circ}\text{C}$ 。

4.4 固定液制备

4.4.1 在 100 mL 容量瓶中加入 0.02 g 伊红 Y(4.2.1)和 9.40 mL 甲醛(4.2.2),用水溶解后定容。混匀后,用砂芯漏斗(4.3.1)过滤,滤液装入试剂瓶,常温保存。

4.4.2 可使用电子粒子计数体细胞仪生产厂提供的固定液。

4.5 乳化剂电解质混合液制备

4.5.1 在 1 L 烧杯中加入 125 mL 乙醇(4.2.3)和 20.0 mL 曲拉通 X—100(4.2.4),仔细混匀;加入 885 mL 氯化钠溶液(4.2.5),混匀后,用砂芯漏斗(4.3.1)过滤;滤液装入试剂瓶,常温保存。

4.5.2 或使用电子粒子计数体细胞仪专用的乳化剂电解质混合液。

4.6 试样的制备

4.6.1 采集的生鲜牛乳应保存在 $2^{\circ}\text{C} \sim 6^{\circ}\text{C}$ 条件下。若 6 h 内未测定,应加硼酸(4.2.6)防腐,硼酸在样品中的浓度不大于 $0.6 \text{ g}/100 \text{ mL}$,贮存温度 $2^{\circ}\text{C} \sim 6^{\circ}\text{C}$,贮存时间不超过 24 h。

4.6.2 采样后应立即固定体细胞,即在混匀的样品中吸取 10 mL 样品,加入 0.2 mL 固定液(4.4),可在采样前在采样管内预先加入以上比例的固定液(4.4),但采样管应密封,以防甲醛挥发。

4.7 测定

将试样(4.6)置于水浴锅(4.3.3)中加热 5 min,取出后颠倒 9 次,再水平振摇 5 次~8 次,然后在不低于 30°C 条件下置入电子粒子计数体细胞仪测定。

4.8 结果

直接读数,单位为千个每毫升。

4.9 允许差

相对相差 $\leq 15\%$ 。

4.10 校正

4.10.1 在以下情况之一应进行校正:

- a) 连续进行 2 个月;
- b) 经长期停用,开始使用时;
- c) 体细胞仪维修后开始使用时。

4.10.2 校正使用专用标样,连续测定 5 次,取出平均值。

4.10.3 标样中体细胞含量为每毫升 40 万个~50 万个,测定平均值与标样指标值的相对误差应为 $\leq 10\%$ 。

4.11 稳定性试验

4.11.1 在 1 个工作日内对体细胞含量为每毫升 50 万个左右的样品,以每 50 个样作规律性的间隔计数。

4.11.2 在 1 个工作日结束时,按式(2)计算变异系数。

$$CV(\%) = \frac{S}{n} \times 100 \dots\dots\dots (2)$$

式中:

CV —— 变异系数,单位为百分率(%);

S —— 数次测定的标准差,单位为个每毫升(个/mL);

n —— 数次测定的平均值,单位为个每毫升(个/mL)。

4.11.3 变异系数应 $\leq 5\%$ 。

5 荧光光电计数体细胞仪法

5.1 原理

样品在荧光光电计数体细胞仪中与染色—缓冲溶液混合后,由显微镜感应细胞核内脱氧核糖核酸染色后产生荧光的染色细胞,转化为电脉冲,经放大记录,直接显示读数。

5.2 试剂

所有试剂均为分析纯试剂,实验用水应符合 GB 6682 中一级水的规格或相当纯度的水。

5.2.1 溴化乙锭($C_{21}H_{20}BrN_3$)。

5.2.2 柠檬酸三钾($C_6H_5O_7K_3 \cdot H_2O$)。

5.2.3 柠檬酸($C_6H_8O_7 \cdot H_2O$)。

5.2.4 曲拉通 X—100(Triton X—100)($C_{34}H_{62}O_{11}$)。

5.2.5 氢氧化铵溶液,25%。

5.2.6 硼酸(H_3BO_3)。

5.2.7 重铬酸钾($K_2Cr_2O_7$)。

5.2.8 叠氮化钠(NaN_3)。

5.3 仪器

5.3.1 荧光光电计数体细胞仪。

5.3.2 水浴锅:恒温 $40^\circ\text{C} \pm 1^\circ\text{C}$ 。

5.4 染色—缓冲溶液制备

5.4.1 染色—缓冲储备液

在 5 L 试剂瓶中加入 1 L 水,在其中溶入 2.5 g 溴化乙锭(5.2.1),搅拌,可加热到 $40^\circ\text{C} \sim 60^\circ\text{C}$,加速溶解;使其完全溶解后,加入 400 g 柠檬酸三钾(5.2.2)和 14.5 g 柠檬酸(5.2.3),再加入 4 L 水,搅拌,使其完全溶解;然后,边搅拌边加入 50 g 曲拉通 X—100(5.2.4),混匀,贮存在避光、密封和阴凉的环境中,90 d 内有效。

5.4.2 染色—缓冲工作液

将 1 份体积染色—缓冲储备液(5.4.1)与 9 份体积水混合,7 d 内有效。

5.4.3 或使用荧光光电计数体细胞仪专用的染色—缓冲工作液。

5.5 清洗液制备

5.5.1 将 10 g 曲拉通 X—100(5.2.4)和 25 mL 氢氧化铵溶液(5.2.5)溶入 10 L 水,仔细搅拌,完全溶解后贮存在密封、阴凉的环境中,25 d 内有效。

5.5.2 或使用荧光光电计数体细胞仪专用清洗液。

5.6 试样的防腐

5.6.1 采样管内生鲜牛乳中加入荧光光电计数体细胞仪专用防腐剂,溶解后充分摇匀。

5.6.2 如无以上防腐剂,则在生鲜牛乳采样后加入以下 1 种防腐剂(24 h 内):

a) 硼酸(5.2.6):在样品中浓度不超过 $0.6\text{ g}/100\text{ mL}$,在 $6^\circ\text{C} \sim 12^\circ\text{C}$ 条件下可保存 24 h;

b) 重铬酸钾(5.2.7):在样品中浓度不超过 $0.2\text{ g}/100\text{ mL}$,在 $6^\circ\text{C} \sim 12^\circ\text{C}$ 条件下可保存 72 h。

5.7 测定

将试样(5.6)置于水浴锅(5.3.2)中加热 5 min,取出后颠倒 9 次,再水平振摇 5 次~8 次,然后在不低于 30°C 条件下置入仪器测定。

5.8 结果

直接读数,单位为千个每毫升。

5.9 允许差

相对相差 $\leq 15\%$ 。

5.10 校正

5.10.1 在以下情况之一应进行校正:

- a) 连续进行 2 个月;
- b) 经长期停用,开始使用时;
- c) 体细胞仪维修后开始使用时。

5.10.2 校正使用专用标样,连续测定 5 次,得出平均值。

5.10.3 标样中体细胞含量为每毫升 40 万个~50 万个,测定平均值与标样指标值的相对误差应 $\leq 10\%$ 。

5.11 稳定性试验

5.11.1 在 1 个工作日内对体细胞含量为每毫升 50 万个左右的样品,以每 50 个样作规律性的间隔计数。

5.11.2 在 1 个工作日结束时,按式(3)计算变异系数。

$$CV(\%) = \frac{S}{n} \times 100 \dots\dots\dots (3)$$

式中:

CV —— 变异系数,单位为百分率(%);

S —— 数次测定的标准差,单位为个每毫升(个/mL);

n —— 数次测定的平均值,单位为个每毫升(个/mL)。

5.11.3 变异系数应 $\leq 5\%$ 。