

黄曲霉毒素 B1 检测试剂盒

使用说明书

(酶联免疫法)

1 原理及用途

本试剂盒采用间接竞争 ELISA 方法检测谷物、饲料样本中的黄曲霉毒素 B1(Aflatoxin B1, AFB1)，试剂盒由预包被偶联抗原的酶标板、辣根酶标记物、抗体、标准品及其他配套试剂组成。检测时，加入标准品或样本溶液，样本中的黄曲霉毒素 B1 和酶标板上预包被偶联抗原竞争抗黄曲霉毒素 B1 抗体，加入酶标记物后，用 TMB 底物显色，样本吸光度值与其所含黄曲霉毒素 B1 含量成负相关，与标准曲线比较即可得出样本中黄曲霉毒素 B1 的残留量。

2 技术指标

2.1 试剂盒灵敏度：0.1ppb(ng/ml)

2.2 反应模式：25℃，30min~15min

2.3 检测下限：

谷物、饲料	1ppb
高油脂饲料	1ppb
浓缩料、配合饲料	2ppb
食用油	1ppb
啤酒	1ppb
酱油	1ppb

2.4 交叉反应率：

黄曲霉毒素 B1	100%
----------	------

2.5 样本回收率：

谷物、饲料	85±15%
高油脂饲料	85±10%
浓缩料、配合饲料	85±10%
食用油	82±15%
啤酒	84±15%
酱油	84±15%

3 试剂盒组成

酶标板	96 孔
标准品（黑盖）：	各 1ml
0ppb、0.1ppb、0.3ppb、0.9ppb、2.7ppb、8.1ppb	
酶标记物（红盖）	5.5ml
抗体工作液（蓝盖）	5.5ml
底物液 A（白盖）	6ml
底物液 B（黑盖）	6ml
终止液（黄盖）	6ml
20×浓缩洗涤液（白盖）	40ml
说明书	1 份
盖板膜	1 张
自封袋	1 个

4 需要的器材和试剂

4.1 仪器：酶标仪、打印机、均质器、氮气吹干装置、振荡器、离心机、恒温培养箱、天平（感量 0.01g）

4.2 微量移液器：单道 20μl-200μl、100μl-1000μl，多道 300μl

4.3 试剂：甲醇、正己烷、三氯甲烷

5 样本前处理

5.1 样本处理前须知：

实验器具必须洁净并使用一次性吸头，以避免污染干扰实验结果。

5.2 配液：

配液 1：样本提取液

70%甲醇，即 V 甲醇：V 去离子水=7：3。

配液 2：工作洗涤液

将 20×浓缩洗涤液 20 倍稀释（1 份 20×浓缩洗涤液加 19 份去离子水）。

配液 3：样本复溶液

35%甲醇，即 V 甲醇：V 去离子水=3.5：6.5。

5.3 样本前处理步骤：

5.3.1 谷物、饲料处理方法

1) 称取 $2\text{g} \pm 0.05\text{g}$ 粉碎样本于 50ml 离心管中，加入 10ml 样本提取液（配液 1），振荡 5min，室温 4000r/min 离心 10min；

2) 取 0.5ml 上清，加入 0.5ml 去离子水，混匀；

3) 取 50μl 进行分析。

样本稀释倍数：10 检测下限：1ppb

5.3.2 高油脂饲料处理方法

1) 称取 $2\text{g} \pm 0.05\text{g}$ 粉碎样本于 50ml 离心管中，加 8ml 正己烷和 10ml 样本提取液（配液 1），振荡 5min，室温 4000r/min 离心 10min；

2) 去除上层液体，取 0.5ml 下层液体加入 0.5ml 去离子水，混匀；

3) 取 50μl 进行分析。

样本稀释倍数：10 检测下限：1ppb

5.3.3 浓缩料、配合饲料处理方法

1) 称取 $2\text{g} \pm 0.05\text{g}$ 粉碎样本于 50ml 离心管中，加 10ml 样本提取液（配液 1），振荡 5min，室温 4000r/min 离心 10min；

2) 取 2ml 上清，加入 4ml 三氯甲烷（或二氯甲烷），振荡 5min，室温 4000r/min 离心 10min；

3) 去除上层液体，取下层液体 2ml 于 50-60℃氮气或空气下吹干；

4) 加入 0.5ml 样本提取液（配液 1）充分溶解干燥物，再加入 0.5ml 去离子水混匀；

5) 取混匀液 0.5ml，加入 0.5ml 样本复溶液（配液 3），混匀；

6) 取 50μl 进行分析。

样本稀释倍数：20 检测下限：2ppb

5.3.4 食用油处理方法

1) 取 2ml 样本于 50ml 离心管中，加入 8ml 正己烷和 10ml 样本提取液（配液 1），振荡 5min，室温 4000r/min 离心 10min；

2) 去除上层液体，取 0.5ml 下层液体加入 0.5ml 去离子水，振荡 30s；

3) 取 50μl 进行分析。

样本稀释倍数：10 检测下限：1ppb

5.3.5 啤酒处理方法

- 1) 将啤酒充分搅拌(去除二氧化碳),取 2ml 啤酒样本,加入 1ml 去离子水,再加入 7ml 甲醇,振荡 5min;
- 2) 取混匀后的样本液 0.5ml 加入 0.5ml 去离子水,混匀;
- 3) 取 50 μ l 进行分析。

样本稀释倍数: 10 检测下限: 1ppb

5.3.6 酱油处理方法

- 1) 取 2ml 样本,加入 2ml 去离子水,再加入 10ml 三氯甲烷,振荡 5min,室温 4000r/min 离心 10min;
- 2) 取下层液体 1ml 于 50-60℃下氮气或空气下吹干;
- 3) 加入 1ml 样本提取液(配液 1)充分溶解干燥物,再加入 1ml 去离子水,混匀;
- 4) 取 50 μ l 进行分析。

样本稀释倍数: 10 检测下限: 1ppb

6 酶联免疫试验步骤

将所需试剂从 4℃冷藏环境中取出,置于室温平衡 30min 以上,洗涤液冷藏时可能会有结晶需恢复到室温以充分溶解,每种液体试剂使用前均须摇匀。取出需要数量的微孔板及框架,将不用的微孔板放入自封袋,保存于 2-8℃。

6.1 编号:将样本和标准品对应微孔按序编号,每个样本和标准品做 2 孔平行,并记录标准孔和样本孔所在的位置。

6.2 加样反应:加标准品或样本 50 μ l/孔到各自的微孔中,然后加酶标记物 50 μ l/孔,再加入 50 μ l/孔的抗体工作液,用盖板膜封板,轻轻振荡 5 秒混匀,25℃反应 30min。

6.3 洗涤:小心揭开盖板膜,甩去孔内液体,每孔加 350 μ l **工作洗涤液**,静置 30 秒后弃去,重复洗涤 5 次,最后一次拍干(用吸水纸拍干,拍干后未被清除的气泡可用干净的枪头刺破)。

6.4 显色:每孔加入底物液 A 50 μ l,再加底物液 B 50 μ l,轻轻振荡 5 秒混匀,25℃避光显色 15min(若蓝色过浅,可适当延长反应时间)。

6.5 终止:每孔加入终止液 50 μ l,轻轻振荡混匀,终止反应。

6.6 测吸光值:用酶标仪于 450nm 处测定每孔吸光度值(建议用双波长 450/630nm)。测定应在终止反应后 10min 内完成。

7 结果分析

7.1 百分吸光率的计算

标准品或样本的百分吸光率等于标准品或样本的吸光度值的平均值(双孔)除以第一个标准品(0ppb)的吸光度值的平均值(双孔),再乘以 100%,即

$$\text{百分吸光率}(\%) = \frac{A}{A_0} \times 100\%$$

A—标准品或样本溶液的平均吸光度值

A0—0ppb 标准品的平均吸光度值

7.2 标准曲线的绘制与计算

以标准品百分吸光率为纵坐标,对应的标准品浓度(ppb)的对数为横坐标,绘制标准品的半对数曲线图。将样本的百分吸光率代入标准曲线中,从标准曲线上读出样本所对应的浓度,乘以其对应的稀释倍数即为样本中待测物的实际浓度。

若利用试剂盒专业分析软件进行计算,更便于大量样本的准确、快速分析。(欢迎来电索取)

8 注意事项

- 8.1 室温低于 25℃或试剂及样本没有回到室温（25℃）会导致所有标准的 OD 值偏低。
- 8.2 在洗板过程中如果出现板孔干燥的情况，则会出现标准曲线不成线性，重复性不好的现象。所以洗板拍干后应立即进行下一步操作。
- 8.3 混合要均匀，洗板要彻底，在 ELISA 分析中的再现性，很大程度上取决于洗板的一致性。
- 8.4 在所有孵育过程中，用盖板膜封住微孔板，避免光线照射。
- 8.5 不要使用过了有效期的试剂盒，不要交换使用不同批号试剂盒中的试剂。
- 8.6 显色液若有任何颜色表明变质，应当弃之。0 标准的吸光度值小于 0.5 个单位（A450nm<0.5）时，表示试剂可能变质。
- 8.7 反应终止液有腐蚀性，避免接触皮肤。

9 贮藏及保存期

储藏条件：试剂盒于 2-8℃保存，避免冷冻。

保质期：该产品有效期为 1 年，生产日期见包装盒。