

黄曲霉毒素 B1 (Aflatoxins B1) ELISA 检测试剂盒说明书

【概要】

黄曲霉毒素是由霉菌属的黄曲霉和寄生曲霉的二次代谢产物。这些霉菌来源于潮湿的热带地区，大面积种植的粮食作物会被其污染。黄曲霉毒素是自然界最危险的致癌物质。

黄曲霉毒素中毒性最强的是黄曲霉毒素 B1，其几乎一直和黄曲霉毒素 B2、G1 和 G2 共存。他们主要存在于玉米、花生、巴西坚果、棉籽和开心果中。美国食品和药品监督管理局 (FDA) 已对食品和饲料中的黄曲霉毒素最高允许水平作了规定，因此，准确测定黄曲霉毒素含量对于食品和饲料的品质监控具有重要意义。

【适用范围】

可定性、定量检测玉米、大米、麦类、豆类、花生、饲料、食用油等样本中的黄曲霉毒素 B1。

检测限: 0.1ppb

交叉反应率:

AFT B1	100%
AFT B2	17%
AFT G1	10%
AFT G2	5%
AFT M1	0.5%

【试验原理】

本试剂盒采用竞争 ELISA，在微孔板上预包被黄曲霉毒素 B1 抗原，加入样本（或黄曲霉毒素 B1 标准品溶液）及辣根过氧化物酶标记的黄曲霉毒素 B1 抗体。样本或标准品溶液中的黄曲霉毒素 B1 与预包被在板孔上的黄曲霉毒素 B1 抗原竞争结合辣根过氧化物酶标记的黄曲霉毒素 B1 抗体。与样本或标准品溶液中的黄曲霉毒素 B1 结合的酶标抗体在洗涤时被除去。再加入 TMB 显色液，读取吸光值。样本的吸光值与其所含残留物黄曲霉毒素 B1 抗原的含量成负相关。对照标准曲线，即可得出相应残留物黄曲霉毒素 B1 的含量。

【试剂盒组成】

- | | |
|----------------|-----|
| 1. 96 孔酶标板 | 1 块 |
| 2. 标准液 (1ml/瓶) | 6 瓶 |

0ppb, 0.1ppb, 0.3ppb, 0.9ppb, 2.7ppb, 8.1ppb

- | | |
|----------------|------|
| 3. 酶标物 1 瓶 | 6ml |
| 4. 显色液 1 瓶 | 12ml |
| 5. 终止液 1 瓶 | 6ml |
| 6. 浓缩洗涤液 (10×) | 40ml |
| 7. 样品稀释液 (10×) | 65ml |
| 8. 操作说明书一份 | |

注意: 标准品含有低浓度黄曲霉毒素、终止液含 2M HCl，需小心取用。勿在有效期外使用本试剂盒。

【需要而未提供的设备及试剂】

设备:

- 微孔板酶标仪 450nm/630nm
- 振荡器
- 涡旋仪
- 离心机
- 天平: 感量 0.01g
- 微量移液器: 单道 20μl~200μl、200μl~1000μl
多道 250μl
- 滤纸

试剂:

- 甲醇
- 石油醚
- 去离子水

【试剂配制】

1、样品稀释液: 用去离子水将浓缩样品稀释液按 1:9 体积比进行稀释 (1 份浓缩样品稀释液+9 份去离子水)。

2、洗涤工作液: 用去离子水将浓缩洗涤液按 1:9 体积比进行稀释。

3、谷物稀释液: 将 0.9g NaCl 用配制完成的样品稀释液溶解定容至 100ml。

4、啤酒稀释液: 取无水甲醇，用配制完成的样品稀释液按 1:4 体积比进行稀释 (1 份甲醇+4 份样品稀释液)。

5、50% 甲醇/水: 取无水甲醇，用去离子水以 1: 1 体积

比进行稀释（1份无水甲醇+1份去离子水）。

6、80%甲醇/水：取无水甲醇，用去离子水以4：1体积比进行稀释（4份无水甲醇+1份去离子水）。

【样本前处理步骤】

（一） 谷物（大米、小米、玉米等低脂谷物）（稀释倍数：8）

- 取1.0g粉碎的样品与8.0ml谷物稀释液混合均匀；
- 强力振荡3分钟；
- 5000g离心10min；
- 取50 μ l稀释后液体待测。

（二） 蛋糕（稀释倍数：10）

- 取1.0g粉碎的样品与4.0ml150%甲醇/水溶液混合均匀；
- 强力振荡3分钟；
- 5000g离心10min；
- 取400 μ l清液，加入600 μ l样品稀释液进行稀释，充分混匀；
- 取50 μ l稀释后液体待测。

（三） 花生、奶油蛋糕（稀释倍数：10）

- 取1.0g粉碎的样品与4.0ml石油醚混合均匀；
- 4.0ml150%甲醇/水溶液混合均匀；
- 强力振荡3分钟；
- 5000g离心10min；
- 取400 μ l下层清液，加入600 μ l样品稀释液进行稀释，充分混匀；
- 取50 μ l稀释后液体待测。

（四） 食用油（稀释倍数：10）

- 取1.0g样品与4.0ml石油醚混合均匀；
- 再加入4ml150%甲醇水溶液混合，振荡1min；
- 静置10min；
- 取400 μ l下层清液，加入600 μ l样品稀释液进行稀释，充分混匀；
- 取50 μ l稀释后液体待测。

（五） 饲料、面粉、汤圆（稀释倍数：24）

- 取3.0g粉碎的样品与9.0ml80%甲醇/水溶液混合均匀；
- 强力振荡3分钟；
- 2000g离心10min；

-----取100 μ l上清液，加入700 μ l样品稀释液进行稀释，充分混匀；

-----取50 μ l稀释后液体待测。

（六） 啤酒（稀释倍数：5）

- 取200 μ l啤酒样品（去除CO₂），加入800 μ l啤酒稀释液；
- 振荡3min；
- 取50 μ l稀释后液体待测。

（七） 酱油、醋、葡萄酒（稀释倍数：8）

- 取0.5ml样品，加入0.5ml蒸馏水并加入4.0ml三氯甲烷；
- 混合振荡3min，5000g离心10min；
- 取1.0ml下层液（三氯甲烷层），60℃氮气吹干；
- 加入100 μ l乙腈溶解干燥物，并加入900 μ l样品稀释液，充分混匀；
- 取50 μ l稀释后液体待测。

【检测步骤】

一、测定前须知：

1. 使用之前将所有试剂和需用板条的温度回升至室温（20~25℃）。
2. 使用之后立即将所有试剂放回2~8℃。
3. 在ELISA分析中的再现性，很大程度上取决于洗板的一致性，正确的洗板操作是ELISA测定程序中的要点。
4. 在所有恒温孵育过程中，避免光线照射，用盖板膜封住微孔板。

二、操作步骤：

1. 将所需试剂从冷藏环境中取出，置于室温（20~25℃）平衡30min以上，注意每种液体试剂使用前均须摇匀。
2. 取出需要数量的微孔板，将不用的微孔板放进原锡箔袋中并且与提供的干燥剂一起重新密封，保存于2~8℃。不要冷冻。
3. 洗涤工作液在使用前也需回温。
4. 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。
5. 加标准品/样本50 μ l到对应的微孔中，加入酶标物50 μ l/孔，轻轻振荡混匀，用盖板膜盖好后置室温避光环境中反应15min。
6. 小心揭开盖板膜，将孔内液体甩干，用洗涤工作液300 μ l/孔，充分洗涤5次，每次间隔30s，用吸水纸拍干。

- 加入显色液 100 μ l/孔, 轻轻振荡混匀, 用盖板膜盖板后置室温避光环境反应 15min。
- 加入终止液 50 μ l/孔, 轻轻振荡混匀, 设定酶标仪于 450nm 处测定每孔 OD 值。

【结果判定】

- 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百分吸光度值的平均值 (双孔) 除以第一个标准 (0 标准) 的吸光度值, 再乘以 100%, 即

$$\text{百分吸光度值 (\%)} = \frac{B}{B_0} \times 100\%$$

B—标准溶液或样本溶液的平均吸光度值

B₀—0 (ppb) 标准溶液的平均吸光度值

- 标准曲线的绘制与计算

以标准品百分吸光率为纵坐标, 以黄曲霉毒素 B1 标准品浓度 (ppb) 的半对数为横坐标, 绘制标准曲线图。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黄曲霉毒素 B1 实际量。

【注意事项】

- 室温低于 20 $^{\circ}$ C 或试剂及样本没有回到室温 (20~25 $^{\circ}$ C) 会导致所有标准的 OD 值偏低。
- 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。
- 每加一种试剂前需将其摇匀。
- 反应终止液为 2M 盐酸, 避免接触皮肤。
- 不要使用过了有效日期的试剂盒; 也不要使用过了有效期的试剂盒中的任何试剂, 掺杂使用过了有效期的试剂盒会引起灵敏度的降低; 不要交换使用不同批号试剂盒中的试剂。
- 储存条件:
保存试剂盒于 2~8 $^{\circ}$ C, 不要冷冻, 将不用的酶标板微孔板放进自封袋重新密封。标准物质和无色的发色剂对光敏感, 因此要避免直接暴露在光线下。
- 试剂变质的迹象:
显色液有任何颜色表明发色剂变质, 应当弃之。0 标准的吸光度 (450/630nm) 值小于 0.5 ($A_{450nm} < 0.5$) 时, 表示试剂可能变质。
- 在加入显色液后, 一般显色时间为 15min 即可。若颜色

较浅, 可延长反应时间 20min (或更长)。反之, 则缩短反应时间。

- 该试剂盒最佳反应温度为 25 $^{\circ}$ C, 温度过高或过低将导致检测吸光度值和灵敏度发生变化。

【贮藏条件及保存期】

贮藏条件: 保存试剂盒于 2~8 $^{\circ}$ C。

保存期: 该产品有效期为 15 个月。

广州信谱徠贸易有限公司

地址: 广州市天河区陂东路20号大院内同广商务大厦自编3号楼3318

联系方式: 020-86273813, 86273027

公司网址: <http://www.xpl-hplc.com>