

## 黄曲霉毒素 M1 (Aflatoxins M1) ELISA 检测试剂盒说明书

### 【概要】

黄曲霉毒素是一类真菌(如黄曲霉和寄生曲霉)的有毒的代谢产物,它们具有很强的致癌性,主要存在于谷物、坚果、棉籽以及一些与人类血液,动物饲料相关的产品中。黄曲霉毒素 M1 是黄曲霉毒素 B1 的羟基化代谢产物,也是一种强致癌物质。牛乳及其制品是易受到黄曲霉毒素 M1 污染的食品之一。Aflatoxin M1 的检测方法有高效液相色谱法(HPLC),薄层层析法(TLC)等。而使用黄曲霉毒素 M1 ELISA 试剂盒则能够快速而准确的分析样品中黄曲霉毒素 M1 残留。

### 【适用范围】

可定性、定量检测牛奶,奶粉等样本中的黄曲霉毒素 M1。

检测限: 0.1ppb

交叉反应率:

AFB1	8%
AFB2	10%
AFG1	7%
AFG2	5%
AFM1	100%

### 【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 M1 标准品溶液)及辣根过氧化物酶标记的黄曲霉毒素 M1 抗体。样本或标准品溶液中的黄曲霉毒素 M1 与预包被在板孔上的黄曲霉毒素 M1 抗原竞争结合辣根过氧化物酶标记的黄曲霉毒素 M1 抗体。未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 M1 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 M1 的含量。

### 【试剂盒组成】

- 96 孔板×1 块
- 标准液×6 瓶: (1.0ml/瓶)  
0ppb, 0.1ppb, 0.3ppb, 0.9ppb, 2.7ppb, 8.1ppb
- 浓缩酶标记物 1 瓶 ..... 1.0ml

- 酶标稀释液 1 瓶 ..... 6ml
- 显色液 1 瓶 ..... 12ml
- 终止液一瓶 ..... 6ml
- 浓缩洗涤液 (10×) 1 瓶 ..... 40ml

### 【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
- 离心机
- 天平: 感量 0.01g
- 微量移液器: 单道 20 $\mu$ l~200 $\mu$ l、200 $\mu$ l~1000 $\mu$ l  
多道 300 $\mu$ l

#### 试剂:

- 去离子水

### 【试剂配制】

- 洗涤工作液: 将浓缩洗涤液用去离子水按 1:9 体积比进行稀释(1 份浓缩洗涤液+9 份去离子水)。
- 酶标物的配制(现用现配,避光保存): 将浓缩酶标记物与酶标稀释液按 1:19 体积比进行稀释(1 份酶标浓缩液+19 份酶标稀释液)。

### 【样本前处理步骤】

#### (一) 牛奶(稀释倍数: 1)

- 取待测样品, 7000rpm 室温下离心, 5min;
- 取下层 50  $\mu$ l 待测。

#### (二) 奶粉(稀释倍数: 5)

- 取 1.0g 奶粉, 加入 5ml 去离子水, 混匀;
- 7000rpm 室温下离心, 5min;
- 取下层 50  $\mu$ l 待测。

### 【检测步骤】

#### 一、测定前须知:

- 使用之前将所有试剂和所需板条回温(20~25 $^{\circ}$ C)。
- 使用之后立即将所有试剂及剩余的板条放置 2~8 $^{\circ}$ C。
- 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 操作中的要点。
- 在所有的恒温孵育过程中,避免光线照射,用盖板膜封住微孔板。

## 二、操作步骤:

1. 将所需试剂从微孔板中取出,放置室温(20~25℃)30min以上,液体试剂使用前均须摇匀。
2. 取出所需数量的微孔板,将不用的微孔板与干燥剂一起重新真空密封,保存于2~8℃。**不可冷冻。**
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 50μl 到对应的微孔中,加入酶标物 50μl/孔,轻轻振荡混匀,用盖板膜盖板后置室温避光反应 30min。
6. 小心揭开盖板膜,用洗涤工作液充分洗涤 300μl/孔,洗板 5 次,每次间隔 30s,用吸水纸拍干。
7. 加入显色液 100μl/孔,轻轻振荡混匀,用盖板膜盖板后置室温避光反应 30min。
8. 加终止液 50μl/孔,轻轻振荡混匀,设酶标仪于 450nm 处读每孔 OD 值。

## 【结果判定】

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

B—标准溶液或样本溶液的平均吸光度值  
B<sub>0</sub>—0(ppb)标准溶液的平均吸光度值
- 2 标准曲线的绘制与计算  
以标准品百分吸光率为纵坐标,黄曲霉毒素 M1 标准品浓度(ppb)的对数为横坐标,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 M1 实际量。

## 【注意事项】

1. 室温低于 20℃或试剂及样本没有恢复到室温(20~25℃)会导致所有标准的 OD 值偏低。
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。
3. 每种试剂使用前均需摇匀。
4. 反应终止液为 2M 盐酸,避免接触皮肤。
5. 不要使用过了有效期的试剂盒;也不要掺杂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。
6. 储存条件:  
试剂盒保存于 2~8℃,不要冷冻,将不用的微孔板重新

真空密封。标准物质和无色的显色剂对光敏感,因此要避光保存。

7. 试剂变质的迹象:  
显色试剂有任何颜色表明显色剂变质,应当弃之。0 标准的吸光度(450/630nm)值小于 0.5 (A<sub>450nm</sub><0.5) 时,表示试剂可能变质。
8. 加入显色液后,一般显色时间为 15~30min。若颜色较浅,可延长反应时间到 35min(或更长),但不得超过 40min。反之,则减短反应时间。
9. 该试剂盒最佳反应温度为 25℃,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℃。

保存期: 该产品有效期为 15 个月。

**广州信谱徕贸易有限公司**  
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>