



黄曲霉毒素(AFT)酶联免疫分析 (ELISA)

试剂盒使用说明书

AE97861

本试剂盒仅供研究使用。

1 使用目的:

本试剂盒用于粮食, 饲料、鱼、虾和肉类组织 (如鸡、牛肉和猪肉), 微生物, 鸡蛋、蜂蜜、牛奶、血清和尿样中黄曲霉毒素(AFT)残留的定量检测。

2 实验原理

本试剂盒采用直接竞争 ELISA 方法, 在微孔板包被有黄曲霉素偶联抗原, 加入黄曲霉毒素(AFT)标准品或样品, 游离黄曲霉毒素(AFT)与微孔条上预包被的黄曲霉毒素(AFT)偶联抗原互相竞争抗黄曲霉毒素(AFT)抗体酶标记物, 用 TMB 底物显色, 加入终止液后颜色由蓝色变为黄色, 用酶标仪在 450nm 波长下进行检测, 吸光值与样品中黄曲霉毒素(AFT)含量成反比, 通过标准曲线计算样品中黄曲霉毒素 (AFT) 的含量。

3 试剂盒组成

- 3.1 预包被的 AFT 偶联抗原的可拆酶标板: 1 块 (12 孔×8 条)。
- 3.2 AFT 标准品: 6 瓶 (1ml/瓶), 含量分别是: 0 ng/ml, 0.1 ng/ml, 0.3 ng/ml, 0.9 ng/ml, 2.7 ng/ml, 8.1 ng/ml。
- 3.3 抗 AFT 抗体酶结合物: 1 瓶 (6ml)。
- 3.4 显色液 A: 1 瓶 (6ml)。
- 3.5 显色液 B: 1 瓶 (6ml)。
- 3.6 终止液: 1 瓶 (6ml), 2M 硫酸。
- 3.7 样本稀释液: 1 瓶 (10×, 6ml), 用于样品稀释用。
- 3.8 浓缩洗涤液: 1 瓶 (20×, 20ml), 用于洗板。
- 3.9 说明书一份。

4 需要而未提供的材料

- 4.1 设备
 - 4.1.1 波长450nm酶标仪。
 - 4.1.2 粉碎机。
 - 4.1.3 量筒。
 - 4.1.4 振荡器。
 - 4.1.5 漏斗。
 - 4.1.6 Whatman No 1或相当的滤纸。
 - 4.1.7 微量移液器。

4.2 试剂

- 4.2.1 去离子水或蒸馏水。
- 4.2.2 甲醇。

5 贮存

- 5.1 试剂盒贮存于2~8℃, 切勿冷冻

5.2 未用完的微孔板应该密封干燥保存

6 注意事项

6.1 使用试剂盒前请仔细阅读说明书。

6.2 不要使用过期试剂盒。

6.3 试剂盒使用前，将试剂恢复至室温（ $25\pm 2^{\circ}\text{C}$ ），建议至少回温2小时。

6.4 标准品中含有黄曲霉毒素(AFT)，使用时应特别注意，操作时应带手套。

6.5 终止液中含有硫酸，使用时防止灼伤皮肤及腐蚀衣物。

6.6 不同标准品、样品所用吸头不能混用，否则会影响试验结果。

6.7 不同批号试剂盒中的试剂不得混用；不同标准品、样品所用吸头不得混用，否则会影响实验结果。

6.8 稀释样本时必须用本试剂盒中的样本稀释液，否则会影响实验结果

6.9 混合试剂时应避免起泡。

7 工作液准备

7.1 AFT标准品溶液：0ng/ml,0.1ng/ml,0.3 ng/ml,0.9 ng/ml,2.7 ng/ml,8.1ng/ml

7.2 浓缩洗涤液：用蒸馏水按1:20(1+19)稀释备用

7.3 样本稀释液：备用

7.3 显色剂：已备用，避免光线直照

7.4 反应终止液：已备用

8 样品处理程序（样品在提取过程中，要严格按说明书操作，提取过程中应准确稀释，否则会出现结果不准确，样品应当保存在阴凉避光之处及冷藏保存）

8.1取10g粉碎的样品，加 20ml 70%甲醇溶液

8.2强力振荡3分钟

8.3用Whatman No 1滤纸过滤

8.4取25 μl 处理后的样品，加入25 μl 样本稀释液于反应孔中（样本稀释倍数为2）

9 酶免分析步骤

9.1 实验须知

9.1.1 实验开始前请将所有试剂于盒外充分恢复至室温（ $25\pm 2^{\circ}\text{C}$ ），时间约2小时。回温至室温（ $25\pm 2^{\circ}\text{C}$ ）后再取出微孔条，多余的微孔条重新密封立即于 $2\sim 8^{\circ}\text{C}$ 干燥保存

注：一定保证回温充分，否则影响检测的精确度和准确度。

9.1.2 使用后请立即将试剂放回 $2\sim 8^{\circ}\text{C}$ 保存

9.1.3 请不要改变分析程序

9.1.4 请使用精确的微量移液器

9.1.5 操作一旦开始，请不要中断任何程序

9.1.6 ELISA结果的可重复性极大程度的取决于操作程序，请严格按照要求操作

9.1.7 为避免交叉污染，每个标准品和样品均应使用不同的吸头加样

9.1.8 加样时请勿让吸头接触微孔中的溶液或内表面

9.2 分析步骤

9.2.1 预先进行编号，标记B0、标准品和样品的位置，推荐进行双孔检测

9.2.2 取所需数量的微孔（微孔条可拆），将多余板条重新密封并立即放回 $2\sim 8^{\circ}\text{C}$ 保存

9.2.3 样品稀释液（10 $\times$ ）、浓缩洗涤液（20 $\times$ ）稀释成工作液(蒸馏水或去离子水稀释)

9.2.4 在B0孔中加入50 μl 0.0 ng/ ml标准品溶液

9.2.5 在各标准孔中加入50 μl 的标准品溶液

9.2.6 在各样品孔中加入50 μ l样品溶液

9.2.7 在所有孔中加入50 μ l的抗黄曲霉毒素(AFT)抗体酶结合物

9.2.8 轻轻晃动反应板几秒钟。

9.3 37 $^{\circ}$ C温浴30min (温浴过程中不时轻拍反应板, 可以减少双孔误差)

9.3.1 甩掉孔中液体, 用洗液洗涤微孔板5次, 最后一次应在吸水纸上拍打以完全除去孔中液体。

9.4 反应

9.4.1 洗涤程序完成后, 立即用微量移液器在每个微孔中先加入50 μ l显色液A, 再加 50 μ l显色液B; 轻微晃动反应板使之彻底混匀

9.4.2 37 $^{\circ}$ C温浴10min

9.4.3 每孔中加入50 μ l终止液, 混匀

9.4.4 在450nm下检测吸光度, 结果在5min内读取。

10 结果计算

10.1 定量分析

10.1.1 所获得的每个浓度标准溶液和样本吸光度值的平均值 (B) 除以第一个标准 (0标准) 的吸光度值 (B0) 再乘以100%, 即百分吸光度值。

B—标准溶液或样本溶液的平均吸光度值

B0—0ng/ ml标准溶液的平均吸光度值

10.1.2 以黄曲霉毒素(AFT)浓度的对数值为X轴, 百分吸光度值为Y轴, 绘制标准曲线图。根据样品百分吸光度值, 可从曲线上得到对应点的横坐标, 即为AFT浓度的对数值, 求得反对数即为测定液中AFT浓度C (ng/ml)

10.1.3 由于样品经过了预先稀释, 因此根据标准曲线所得出的样品浓度一定要再乘以其稀释倍数。

10.2 半定量测定

10.1.1 目测半定量测定: 首先选择一个适当的标准液与样品同运行, 根据样品与标准品颜色深浅比较, 判断样品浓度值是小于还是大于标准值。

10.1.2 仪器半定量测定: 首先选择一个适当的标准液与样品同运行, 根据样品与标准品吸光度值的高低比较, 判断样品浓度值是小于还是大于标准值。

11 特异性

物质 交叉反应

黄曲霉毒素(AFT) 100%

12 试剂盒参数

本试剂盒检测下限为0.05 ng/ml

B0吸光度最佳值应大于1.0

试剂盒吸光度板内误差小于8%, 板间误差小于15%。

用本说明书提供的组织样本提取方法回收率大于80%。

13

试剂盒提供的标准曲线范围为0.1ng/ml~8.1ng/ml。

14 分析限制

本试剂盒检测为阳性的样品应该用另一种方法如HPLC或GC/MS加以确证。

