



# 黄曲霉毒素 B<sub>1</sub> 酶联免疫定量检测试剂盒说明书

ELISA kit for quantitative detection of aflatoxin B<sub>1</sub>

## 一、概要

黄曲霉毒素主要是两种霉菌黄曲霉及 *A. paraticus* 的二级代谢物。这些霉菌在湿热的环境和耕作土地上污染的植物产生。黄曲霉毒素 B<sub>1</sub> (AFB<sub>1</sub>) 属于自然最强烈的致癌物质，它一般产生于花生、玉米、巴西坚果和棉花种子中。

本试剂盒利用酶联免疫吸附测定法 (ELISA) 对各种谷物、饲料及其他食品中的 AFB<sub>1</sub> 含量进行快速、定量检测。

## 二、原理

本试剂盒是利用直接竞争酶联免疫吸附微孔模式进行检测，灵敏度可达 0.1 µg/kg (ppb)。样品或标准品中游离的黄曲霉毒素 B<sub>1</sub> 与酶标抗原竞争结合包被在微孔中的抗体上的结合位点，经洗板洗去多余的酶标抗原与黄曲霉毒素 B<sub>1</sub> 后加入显色剂与反应底物，其与酶标物作用而成蓝色，加入反应停止液后颜色由蓝色转变为黄色，黄色越深则表明黄曲霉毒素 B<sub>1</sub> 越少，用酶标仪在 450 nm 处测定光吸收值可准确定量检测样品中的黄曲霉毒素 B<sub>1</sub> 的污染水平。

## 三、试剂盒构成

- |  |      |
|--|------|
| 1、反应板支架  | 1 块  |
| 2 黄曲霉毒素 B <sub>1</sub> 抗体包被反应板   | 96 孔 |
| 3、黄曲霉毒素 B <sub>1</sub> 标准品溶液 (0 ppb, 0.1 ppb, 0.25 ppb, 0.5 ppb, 1 ppb, 2 ppb) | 1 套  |
| 4、酶标记物   | 4 瓶  |
| 5、酶稀释液   | 1 瓶  |
| 6、样品稀释液  | 1 瓶  |
| 7、显色剂溶液  | 1 瓶  |
| 8、反应底物溶液   | 1 瓶  |
| 9、终止液  | 1 瓶  |
| 10、浓缩洗涤液 (20 X)  | 1 瓶  |

## 四、注意事项

- 1、试剂盒请置于 2-8℃ 条件下保存，使用过程中不要让微孔干燥，使用后应立即将试剂放回至 2-8℃ 条件下冷藏。
- 2、标准品和无色的显色剂对光敏感，避免直接暴露在光线下。
- 3、吸取不同的液体后，要更换枪头，即使是吸取标准品时。
- 4、尽量避免所有试剂接触皮肤。
- 5、试剂盒应在有效期内使用。不同批号的试剂盒不能混用。试剂稀释或掺杂使用会使灵敏度降低。

## 五、样品处理

### 1、花生

样品去皮粉碎(刀切或剪切)，称取 5.0 g 于 100 mL 具塞三角瓶中。加入 25 mL 甲醇水(1:1)溶液和 20 mL 正己烷(或石油醚)，振荡 15 min，过滤于分液漏斗中，静置分层，放出下层甲醇水提取液，用样品稀释液将提取液稀释 3 倍 (例如取 0.5 ml 提取液+1.5 ml 样品稀释液)，即为待测样液。

将待测样液进行定量或限量测定。

### 2、核桃

样品粉碎，称取 5.0 g 于 100 mL 具塞三角瓶中。加入 25 mL 甲醇水(1+1)溶液和 20mL 正己烷(或石油醚)，振荡 15 min，过滤于分液漏斗中，静置分层，放出下层甲醇水提取液，用样品稀释液将提取液稀释 1 倍 (例如取 0.5 ml 提取液 + 0.5 ml 样品稀释液)，即为待测样液。

将待测样液进行定量或限量测定。

上海佑隆生物生物科技有限公司

联系电话: 021-60955248; 传真: 021-60955249;

[www.youlong-bio.com.cn](http://www.youlong-bio.com.cn)

E-mail: [info@youlong-bio.com.cn](mailto:info@youlong-bio.com.cn)



# 黄曲霉毒素 B<sub>1</sub> 酶联免疫定量检测试剂盒说明书

ELISA kit for quantitative detection of aflatoxin B<sub>1</sub>

## 3、牛奶

将含脂牛奶降温至 10℃ 以下，3500 转/分钟下离心 10 min，用吸管弃去上层脂肪层，取下层牛奶液用样品稀释液稀释 4 倍（例如取 0.5 ml 提取液 + 2.0 ml 样品稀释液即为待测液。

## 4、奶粉

称取 5 g 奶粉于 100 ml 三角瓶中，加入 40 ml 蒸馏水，振摇 5 min，使其完全溶解。将（含脂）牛奶降温至 10℃ 以下，3500 转/分钟下离心 10 min，用吸管弃去上层脂肪层，取下层牛奶液用样品稀释液稀释 4 倍（例如取 0.5 ml 提取液 + 2.0 ml 样品稀释液即为待测液。

## 六、实验步骤

### (一)实验准备

1、使用前请先将试剂盒拿出冰箱，放到室温环境下回温 10 min。

2、本试剂盒所提供的酶标记物是浓缩液，使用前请先用酶稀释液进行稀释。用 1.5 mL 酶稀释液将 1 瓶酶标记物溶解，配制的工作液够 24 孔使用。

3、本试剂盒所提供的浓缩洗涤液用蒸馏水稀释 20 倍后即可使用。例如：2 mL 浓缩洗涤液+38 mL 蒸馏水，足够 24 孔使用。

### (二)测定程序

1、根据样品检测数插入足够数量的酶标板微孔于反应板支架上。标记好空白对照孔、标准品孔、样品孔。然后每孔加入 250 μL 左右洗涤液，放置 1 min，倒掉液体后将酶标板在报纸或毛纸上用力拍干。

2、在空白对照孔中加入 50 μL 样品稀释液，在各个标准品孔中加入 50 μL 黄曲霉毒素 B<sub>1</sub> 标准品(0 ppb、0.1 ppb、0.25 ppb、0.5 ppb、1 ppb、2 ppb)，在样品孔中加入 50 μL 样品液。

3、在空白对照孔中加入 50 μL 酶稀释液，其他孔都加入 50 μL 稀释后的酶标记物溶液。轻轻摇匀混合，然后在 37℃ 恒温孵育 30 min。

4、孵育结束后甩掉微孔中的液体，然后每孔加入 250 μL 左右稀释好的洗涤液，放置 1 min，倒掉液体。重复洗涤 3 次。倒掉液体后将酶标板在报纸或毛纸上用力拍干。

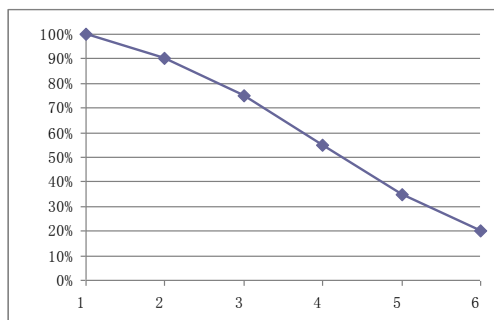
5、每孔分别加入 50 μL 显色剂和 50 μL 反应底物，轻轻摇匀混合后，恒温孵育箱中 37℃ 显色 15 min。

6、显色反应结束后每孔加入 50 μL 终止液。用酶标仪在 450 nm 处进行测定。必须在加入终止液后 10 min 内完成。

## 七、结果判定

用酶标仪在 450 nm 处测得每孔的光吸收值(A)绘制标准曲线。通过标准曲线，可准确定量样品中黄曲霉毒素 B<sub>1</sub> 的含量。

标准曲线：横坐标为黄曲霉毒素 B<sub>1</sub> 标准品浓度，纵坐标为百分比（即各标准品孔和样品孔光吸收值除以 0 ppb 标准品孔光吸收值再乘以 100% 所得）。相应每个样品的黄曲霉毒素 B<sub>1</sub> 浓度可从曲线上获得。



标准曲线（仅作参考）



# 黄曲霉毒素 B<sub>1</sub> 酶联免疫定量检测试剂盒说明书

ELISA kit for quantitative detection of aflatoxin B<sub>1</sub>

## 八、酶标计算专业软件

酶联免疫测定法 (ELISA) 是目前食品安全检测、医疗检测以及环境监测等中最广泛的免疫分析方法, 可用于目标物质的定量测定。一般而言, 在未知样品测定前, 需测定梯度标准物质建立标准曲线方程。然后根据未知样品的 OD 值或者其变化值, 代入标准曲线方程, 获得未知样品中待测物质的浓度。然而, 常规方法均使用手动计算或者绘制图, 来获得一个个的最终数据, 该方法费时、繁琐以及人为错误概率高。

据此, 本公司开发出酶标计算专业软件 (YL software 1.0 版), 专门解决该酶标测定中的计算难题, 并可根据实际需要, 自动调整计算数目, 最多可同时计算一整块酶标板 (96 孔) 的数据, 并可同时导出通用 excel 文档, 编辑和保存。根据实际中的应用, 该软件分为两种计算模式: 单孔模式与双孔模式。双孔模式即取该点的两个值进行取平均值再进行计算, 最终根据数据来判定是否合格, 未合格以及未检测。

1	0.5	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0

样品序号	吸光度值	氯霉素含量	结果判定	送样单位	检测单位
样品1	1	1.25	合格		2010-7-13
样品2	0.5	3.96	不合格		

