

黄曲霉毒素 B₁ ELISA 快速检测试剂盒操作说明书

目 录

一. 简介.....	2
二. 试剂盒组成.....	2
三. 贮存条件, 有效期与生产批号.....	2
四. 定量检测程序、.....	2
五. 限量(定性)检测程序.....	3
六. 样品处理程序.....	3
七. 自备仪器及试剂.....	5
八. 国家标准.....	5
九. 常见故障分析.....	6

贮存: 2-8℃贮存, 忌 0℃以下冻存, 有效期 10 个月。

生产批号: 见外包装盒

一、简介

本试剂盒采用固相酶联免疫吸附 ELISA 原理，通过抗黄曲霉毒素 B₁(AFB₁) 抗体与酶标抗原、待测抗原的竞争免疫反应，以及酶的催化显色反应来检测 AFB₁，优点是灵敏度高，特异性好，操作简便，结果易判读，适用于食品、饲料及相关原料中 AFB₁ 的定性定量检测。

样品前处理包括：提取、过滤、稀释，处理时间大约为 20-40 分钟。

本试剂盒的检测限为：1 ppb 谷物/饲料中 AFB₁ 回收率≥80%。批内、批间变异系数<15%。

二、试剂盒组成

A. 24/48/96 孔 AFB ₁ 酶标板：	3/6/12 条×8 孔
B. 20×浓缩洗涤液：25ml（用蒸馏水稀释 20 倍使用）	1 瓶
C. AFB ₁ 抗体：3/4/6ml	1 瓶（红盖）
D. 酶结合物：3/4.5/6 ml	1 瓶（绿盖）
E. 显色液：3/6/12 ml	1 瓶（蓝盖）
F. 终止液：4.5/7 ml	1 瓶（黄盖）
G. AFB ₁ 标准品：1.5/2ml/瓶（0、5、10、20、50ppb）	各 1 瓶
H. 操作说明书	1 份

注意：标准品溶液含有 AFB₁，需小心取用，虽 AFB₁ 标准品浓度很低，但是严格规范的实验操作不可忽视，凡接触到标样的器皿都要用 5%次氯酸钠浸泡半天后再清洗备用。终止液含 2 N H₂SO₄ 避免沾染到皮肤（请带手套操作）。勿在有效期外使用本试剂盒或不同批次的试剂混用。AFB₁ 标准品的实际浓度为 0、0.25、0.5、1 和 2.5ng/ml。

三、贮存条件、有效期与生产批号

2-8℃贮存，忌 0℃以下冻存，规格及有效期（生产批号）见试剂盒外包装。

四、定量检测程序

4.1 实验准备：从冰箱取出试剂盒，恢复至室温后，打开锡箔袋，取出所需数量的板条插入微孔架，记录空白、AFB₁ 标准品①②③④⑤号及样品的位置（可参照下表所示）。其余板条封口后放入冰箱。将 20 倍浓缩洗涤液用超纯水或蒸馏水稀释 20 倍，待用。

	1	2	3-12
A	空白	样品	
B	标准品①	样品	
C	标准品②	样品	
D	标准品③	样品	
E	标准品④	样品	
F	标准品⑤	样品	
G	样品	样品	
H	样品	样品	

4.2 反应：空白孔加入 150 μl 洗涤液（不加 AFB₁ 抗体和酶结合物）。AFB₁ 标准品孔和样品孔相应地加入标准品（①②③④⑤）和待检样品提取液 50 μl/孔（如上表所示加入）、再加入 AFB₁ 抗体（50 μl /孔）和酶结合物（50 μl/孔），此时各孔中溶液体积为 150 μl。将酶标板在水平桌面上轻微振荡（注意避免液体溅出），使之混匀。将上

述板条置密闭容器内，放入温箱内（37℃）温育 30 分钟。

注意：此操作步骤要快，尽量保持前后孔温育时间一致，每次加样须更换新的吸头。

4.3 洗板：甩出孔中的液体，将微孔架倒置在吸水纸上拍打以保证完全除去孔中的液体。用洗瓶或移液器将洗涤液加入各孔中(满孔)。再次甩出孔中液体（完全除去孔中的液体），再重复操作洗涤步骤三次(共洗四次)。

4.4 显色：将洗好的板条平放，加入显色液 100 μl /孔，将板条置于密闭容器，放入温箱内显色（37℃）5 分钟（若显色较浅，可适当延长，但不宜超过 10 分钟）。

4.5 终止及测定：将显色完毕的板条取出，加入终止液 50 μl/孔，轻微震荡混匀，以空白孔调零，在 450 nm 处测量吸光值 A（在加入终止液 5 分钟内读取光度值）。

4.6 结果判定：以 AFB₁ 标准品浓度 5ppb、10ppb、20ppb、50ppb 的常用对数值 (lgC) 为横坐标，各浓度标准品相应的吸光值 A 与 0ppb 的标准品 A 值的比值 (B/B₀%) 为纵坐标 [B/B₀% = 标准品 (或样品) 的吸光值 / 0ppb 标准品的吸光值 × 100%]，绘制标准曲线。根据样品孔的吸光值计算样品的 B/B₀% 值，查标准曲线，可得到相应样品中 AFB₁ 的含量 (已考虑样品提取的稀释倍数，结果无需换算)。(或可直接用 RADEWIN 等专用 ELISA 分析软件对数据进行分析得出结果)。如果检测结果高于检测上限，请将待测样品提取液用 30% 甲醇/水（甲醇/水体积比为 30:70）稀释后再检测，测定结果乘以相应的稀释倍数。

五、 限量(定性)检测程序

样品处理程序见六，适用于同时定性检测多个限量标准不同的样品，以 AFB₁ 标准品②号 (5ppb) 作参照进行定性比较，不需作标准曲线。待测样品提取液根据限量标准的不同，用样品稀释液 (30% 的甲醇水溶液) 按下表稀释：

限量标准	≤5ppb	≤10ppb	≤20ppb	≤50ppb
待检样品提取液	1ml	0.5ml	0.2ml	0.1ml
30%的甲醇水	0	0.5ml	0.6ml	0.9ml
稀释倍数	1	2	4	10

5.1 实验准备：从冰箱取出试剂盒，恢复至室温后，打开锡箔袋，取出所需数量的板条插入微孔架，记录空白、AFB₁ 标准品②号及样品的位置，其余板条封口后放入冰箱。

5.2 加样：空白孔加入 150 μl 洗涤液 (不加抗体和酶结合物)；AFB₁ 标准品参照孔、样品孔分别加入标准品②号和稀释后的样品提取液各 50 μl/孔、再加入 AFB₁ 抗体 (50 μl /孔) 和酶结合物 (50 μl/孔)，此时各孔中溶液体积为 150 μl。将酶标板在水平桌面上轻微振荡 (注意避免液体溅出)，使之混匀。将上述板条置密闭容器内，放入温箱内（37℃）温育 30 分钟。**注意：此操作步骤要快，尽量保持前后孔温育时间一致，每次加样须更换新的吸头。**

5.3 洗板：参照 4.3

5.4 显色：参照 4.4

5.5 终止及读值：参照 4.5 (目测不加终止液)

5.6 结果判定：目测法 (未加终止液前目测)：比较样品孔与标准品参照孔的颜色，若显色比标准品参照浅者，则为阳性，样品中 AFB₁ 的含量超出限量标准；若深者，则为阴性；若颜色接近，则需用酶标仪测吸光值比较。仪器法：酶标仪检测在 450nm 波长处各孔的吸光值 A，若样品的 A 值 < 标准参照的 A 值，为阳性，表示样品中 AFB₁ 的含量超出限量标准；若样品 A 值 ≥ 标准参照 A 值，为阴性。

六、 样品处理程序

实验准备：配制 60% 甲醇水溶液 (V/V, 60:40) 和 20% 甲醇水溶液 (V/V, 20:80)。

注意：请精确配制上述溶液，以免影响检测的准确性。

6.1 脂肪含量低的固体样品 (如大米、玉米、小麦和饲料等)

- 称取 5g 粉碎样品于 100ml 带塞三角瓶内，准确加入 25ml 60% 甲醇水溶液。

- 将加入了甲醇水溶液的样品放入振荡器内（或用手强力振荡），充分振荡 3min，用滤纸过滤，收集滤液。
- 取滤液 2mL，加入 6 mL 20%甲醇水溶液，混匀（若浑浊用滤纸过滤），此为样品待检液。

6.2 酱油、醋

- 称取 5 g 样品于 25ml 小烧杯中，用 10ml 蒸馏水将试样转移到 125ml 分液漏斗中，加入 25ml 三氯甲烷，加塞轻轻振摇 3min，静置分层。
- 放出下层三氯甲烷层，取 5ml 于 20ml 蒸发皿中，65℃水浴通风挥干。挥干冷却后，准确加入 5ml 60%甲醇水溶液，将蒸发皿中的凝结物充分溶解。
- 取滤液 2mL，加入 6 mL 20%甲醇水溶液，混匀（若浑浊用滤纸过滤），此为样品待检液。

6.3 食用油（如菜油、麻油、色拉油、花生油等）

- 称 5 g 油样于 25ml 小烧杯中，用 20ml 石油醚或正己烷分次将试样转移至 125ml 分液漏斗中，准确加入 60% 甲醇水溶液 25ml 溶液，加塞轻轻振摇 5min，静置分层，放出下层 60%甲醇水提取液。
- 取滤液 2mL，加入 6 mL 20%甲醇水溶液，混匀（若浑浊用滤纸过滤），此为样品待检液。

6.4 酒类

- 称取 5 g 样品于 125ml 分液漏斗中，加入 25ml 三氯甲烷，加塞轻轻振摇 3min，静置分层。
- 放出下层三氯甲烷层，取 5ml 于 20ml 蒸发皿中，65℃水浴通风挥干。挥干冷却后，准确加入 60%甲醇水溶液 5ml，将蒸发皿中的凝结物充分溶解。
- 取滤液 2mL，加入 6 mL 20%甲醇水溶液，混（若浑浊用滤纸过滤），此为样品待检液。

6.5 花生

- 样品去皮粉碎（刀切或剪切），称取 5g 于 100ml 具塞三角瓶中。加入 60%甲醇水溶液 25ml 和 20ml 正己烷（或石油醚），振摇 10min，用定性滤纸过滤。
- 收集滤液于 125ml 分液漏斗中，静置分层后放出下层 60%甲醇水提取液。
- 取滤液 2mL，加入 6 mL 20%甲醇水溶液，混匀（若浑浊用滤纸过滤），此为样品待检液。

6.6 月饼、桃酥、花生酱等

- 称取 5g 粉碎样品于 125ml 具塞锥形瓶中，准确加入 60%甲醇水溶液 25ml 和 20ml 正己烷（或石油醚）加塞震荡 10min，过滤，收集滤液于分液漏斗中，静置分层。
- 待下层甲醇水溶液澄清后，放出甲醇水溶液于另一锥形瓶中。吸取 10ml 甲醇水提取液于 125ml 分液漏斗中，加入 20ml 三氯甲烷，加塞轻轻振摇 3min，静置分层。放出下层三氯甲烷层，取 10ml 于 20ml 蒸发皿中，65℃水浴通风挥干。挥干冷却后，准确加入 60%甲醇水溶液 5ml，将蒸发皿中的凝结物充分溶解。
- 取滤液 2mL，加入 6 mL 20%甲醇水溶液，混匀（若浑浊用滤纸过滤），此为样品待检液。

6.7 面粉、饲料浓缩料

- 称取 5 g 样品于 125ml 具塞锥形瓶中，准确加入 60%甲醇水溶液 25ml 加塞震荡 10min，过滤，收集滤液。
- 吸取 10ml 滤液于 125ml 分液漏斗中，加入 20ml 三氯甲烷，加塞振摇 3min，静置分层。放出下层三氯甲烷层，取 10ml 于 20ml 蒸发皿中，65℃水浴通风挥干。挥干冷却后，准确加入 60%甲醇水溶液 5ml，将蒸发皿中的凝结物充分溶解。
- 取滤液 2mL，加入 6 mL 20%甲醇水溶液，混匀（若浑浊用滤纸过滤），此为样品待检液。

注意：

- 某些样品(如花生等)提取后久置影响检测结果的准确性，为保证检测的准确性，样品提取后请即时检测。
- 若待测样品提取液不立即检测，请将其存储于棕色玻璃瓶内，2-8℃避光保存。
- 试剂盒在使用前，请将试剂盒内所有试剂放到室内温度（20-25℃）进行温度平衡；试剂用完后立即将其放置回 2-8℃冰箱内保存。
- 在每个步骤操作时，速度要快，不要将板孔暴露在空气中时间过久，避免酶标板变干。未用完的酶标板需密闭于自封袋内，防止受潮且避光保存于 2-8℃冰箱内。
- 在温育时，避免光照，建议将板孔置于密闭容器内进行温育。
- 若样品数量超过 20 份，请用多通道加样器操作。

七、 自备仪器及试剂

1. 酶标仪（内置 450nm 滤光片）或黄曲霉素 B₁ 专用测定仪
2. 20-200ul 微量移液器及配套吸头
3. 恒温培养箱（0℃-50℃）、冰箱（4℃-8℃）、感量 0.01g 的天平、小型粉碎机或碾钵
4. 玻璃器皿：锥形瓶，烧杯，分液漏斗，蒸发皿。量筒，具塞试管，滴管，移液管等
5. 其他：三氯甲烷、甲醇、滤纸、吸水纸等

八、 国家标准

标准名称	标准号	实施日期	适用范围	指标(μg/kg)
食品中黄曲霉毒素 B ₁ 允许量标准	GB2761-2011	2011-10-20	玉米、花生仁、花生油； 玉米及花生仁制品(按原料折算)； 大米、其它食用油； 其它粮食、豆类、发酵食品； 婴儿代乳食品； 坚果及籽类； 酱油、食醋、发酵酒(以粮食为主要原料)；	≤20 ≤20 ≤10 ≤5 ≤0.5（以粉状产品计） ≤5 ≤5
饲料卫生标准	GB13078-2001	2001-10-1	玉米、花生饼（粕）、棉籽饼（粕）、菜籽饼（粕）； 豆粕； 肉用仔鸡前期、雏鸡配合饲料及浓缩饲料、仔猪配合饲料及浓缩饲料、牛奶精料补充料； 肉用仔鸡后期、生长鸡、产蛋鸡配合饲料级浓缩饲料、鹌鹑配合饲料及浓缩料； 生长肥育猪、种猪配合饲料及浓缩饲料； 肉牛精料补充料；	≤50 ≤30 ≤10 ≤20 ≤20 ≤50

九、 常见故障分析

	问题及现象	原因	解决办法
1	整块板反应未产生颜色或整体吸光度值偏低	<ol style="list-style-type: none"> 1. 被检测物污染了处理样品用的容器。 2. 由于重复使用吸头导致抗体污染了酶标记物 3. 室温过低或试剂未回室温 4. 洗涤水未回升到室温 5. 试剂过有效期 6. 试剂失效 	<ol style="list-style-type: none"> 1. 注意妥善处理装标准液的瓶子及被检测物纯品试剂，不要与样品瓶同水槽洗涤 2. 不要重复使用吸头 3. 控制室温至 20-25℃并确保试剂回室温 4. 使洗涤水回升至室温 5. 更换新批号的试剂盒 6. 与我公司联系

山西德丰信成生物科技有限公司

2	整行或整列板孔最终反应颜色异常	<ol style="list-style-type: none"> 1. 手工洗板时相对应的吸头与移液器接触不严，导致空吸或吸液量不够 2. 洗板机洗板时相对应的管路阻塞，导致未注入洗涤用水或水量不够 	<ol style="list-style-type: none"> 1. 洗板前检查吸头是否牢固，是否高矮一致且在一条直线上 2. 检查管路是否阻塞，检查注水量是否充分
3	标准曲线不成良好的 S 型	<ol style="list-style-type: none"> 1. 手工洗板步骤失败，洗涤液被板孔中洗涤物污染 2. 洗板机洗板步骤失败，洗板次数不够及注水量不够 3. 洗板后未立即进行下一步操作，中间间隔过长 4. 孔中含有两种以上的试剂时未能充分混匀 	<ol style="list-style-type: none"> 1. 在微孔板上板面上方约 0.5cm 处打出洗涤水，避免注入板孔中的液体接触到移液器管尖而将孔中物质带回到洗涤液中 2. 洗板机洗板的注水量为 400μL，注水后的液面应该接近板平面并且洗涤四次以上 3. 洗板后立即进行下一步操作，不要中断轻轻振荡板并在桌面上做圆周运动以混匀或用振荡器混匀
4	零标准的吸光度接近或低于第二标准吸光度值	<ol style="list-style-type: none"> 1. 洗板后未立即进行下一步操作，中间间隔过长导致板孔干燥 2. 试剂盒或试剂回温不够 	<ol style="list-style-type: none"> 1. 洗板后立即进行下一步操作，不要中断 2. 确保试剂及洗涤水回升至 20-25$^{\circ}$C
5	整块板最终反应颜色的吸光度值都很高	<ol style="list-style-type: none"> 1. 酶标记物污染了盒内的其它试剂，吸过酶标记物的吸头再次使用 	<ol style="list-style-type: none"> 1. 不要重复使用吸头
6	平行性不好	<ol style="list-style-type: none"> 1. 加样量是否准确 2. 加样及加样操作是否正确 3. 洗板问题 	<ol style="list-style-type: none"> 1. 使用较好的移液器及吸头 2. 正确加样 3. 参阅问题 3 中，洗板问题的阐述

总部地址：山西省太原市高新区长治路 227 号高新国际 1302 室 邮编：030006
 电 话：0351-7435555 传 真：0351-7435555 Http: //defcred.cn.alibaba.com

研发中心：江西省南昌市南昌大学北区中德联合研究院 邮编：330047
 电 话：0791-88305965 技术服务热线：0791-88305177 转 8222