



酶联免疫法检测黄曲霉毒素 B₁

Celer AFLA B₁ 是用于黄曲霉毒素 B₁ 定量分析的 ELISA 试剂盒。

试剂盒包含 96 孔及实验所需材料，包括标准品。

需要实验室配备酶标仪。

检测范围

谷物 (玉米, 高粱), 高水分玉米, 青贮和麦麸, 饲料, 坚果 (榛子, 开心果, 花生, 杏仁), 干果(葡萄干, 无花果), DDGS, 棉籽, 大豆, 豆粕。

样品前处理

- 谷物, 高水分玉米, 青贮和麦麸, 饲料, 坚果, 干果, DDGS 和豆粕: 粉碎均质, 甲醇水提取, 过滤
- 棉籽: 粉碎均质, 甲醇水溶液提取, 沉降。

分析时间: 15 分钟 (不包括样品前处理时间)。

检出限

1 ppb

特异性

组分	交叉反应率 %
Aflatoxin B ₁	100
Aflatoxin B ₂	5 ± 1
Aflatoxin G ₁	19 ± 1
Aflatoxin G ₂	<1

1 检测原理

该测定在已经包被有抗黄曲霉毒素抗体的微孔中进行。在预混合孔中, 将酶标记的黄曲霉毒素和标准溶液或样品混合, 然后转移到抗黄曲霉毒素微孔板中。在第一次孵育期间, 标准溶液/样品中的游离黄曲霉毒素和酶标记的黄曲霉毒素竞争固相上的抗黄曲霉毒素抗体结合位点。然后在洗涤步骤中除去任何未结合的酶缀合物和黄曲霉毒素分子。加入固定量的生色底物测定结合的酶活性。该酶将无色色原体转化为蓝色产物。添加终止试剂会导致颜色从蓝色变为黄色。

用酶标仪在 450nm 处测量吸光度。溶液颜色的深浅与标准溶液/样品中的黄曲霉毒素 B₁ 浓度成反比。

2 提供的试剂

预混合板: 96 孔, 未经包被的空白孔。

微孔板: 96 孔, 包被有抗黄曲霉毒素抗体, 装于带有干燥剂的铝箔袋中。

微孔板可独立拆分, 单独使用

黄曲霉毒素 B₁ 标准品: 5 瓶, 浓度分别为 0 ppb; 1 ppb; 5 ppb; 20 ppb; 40 ppb

酶耦合剂: 1 瓶

洗涤缓冲液 10x: 1 瓶

发展液: 1 瓶

终止液: 1 瓶, 白色盖子。

3 未提供的试剂及设备

- 蒸馏水
- 甲醇
- 80% 甲醇 (干果); 霉菌毒素提取液 A" code Tecna ME070 或 70% 甲醇(谷物, 饲料, 高水分玉米, 青贮和麦麸, DDGS, 棉籽); 60% 甲醇 (坚果, 豆粕)。
- 氯化钠。

设备

- 天平
- 粉碎机或研磨机。
- 振荡器 (可选)
- 滤纸 (Whatman 1)
- 离心机 (可选)
- 20-200 µl 微量可调移液器
- 50-300 µl 多通道微量可调移液器
- 酶标仪。

4 使用者注意事项

- 该产品仅供体外诊断使用。
- 某些试剂含有可能被法规 (EC) No 1272/2008 确定为危险物质的溶液。请参阅 Tecna 网站上提供的安全数据表。
- 小心处理试剂, 避免接触皮肤, 眼睛和黏膜。

5 处理和存储说明

- 将试剂盒存储在 +2 / + 8 °C, 不能冷冻。

- 将未使用的微孔板放回到装有干燥剂的铝箔袋中。
- 不要使用过期的产品。
- 不要混合不同试剂盒内的试剂。
- 严格按照试剂盒内附带的说明书进行操作。

6 样品处理

6.1 谷物和饲料

- 充分混匀待测样品。
- 细细粉碎样品。
- 称取粉碎后的样品，选择下表中描述的任一选项

样品量	NaCl	提取液
50 g	10 g	250 ml 70% 甲醇
5 g	1 g	25 ml 70% 甲醇
50 g	/	250 ml 70% 甲醇, 4% NaCl*
5 g	/	25 ml 70% 甲醇, 4% NaCl*

* 用 70% 甲醇 和 4% NaCl 制备提取溶液:

100 ml 溶液为例: 将 4 克 NaCl 溶解在 20ml 去离子水或蒸馏水中, 加入 70 ml 甲醇, 然后加入去离子水或蒸馏水至 100ml.

- 充分振荡 3 分钟。
- 过滤样品 (Whatman 1) 并收集滤液。
- 如果样品浓度 >40 ppb, 用 70% 甲醇溶液稀释 5 倍 (1 份滤液+4 份 70% 甲醇), 得到 5-200 ppb 的检测范围。
为了使样品更具有代表性, 建议选择称取 50g 样品的方式。

6.1.1 高水分玉米

- 根据 6.1 的过程提取样品。
- 要将结果与干物质联系起来, 请考虑样品水分百分比。

6.1.2 青贮和麦麸

- 根据 6.1 的过程提取样品。用 5M NaOH 调节 pH 值至 6.5-7.5。
- 如果分析干燥的样品, 建议在温度不高于 60 °C 时进行干燥。

6.2 坚果, 大豆, 豆粕

- 充分混匀待测样品。
- 细细粉碎样品。
- 称取 50 g 粉碎后的样品并添加 10 g NaCl, 添加 250 ml 60% 甲醇水溶液。另外: 称取 5 g 粉碎后的样品添加 1 g NaCl, 添加 25 ml 60% 甲醇水溶液。注意: 可以制备已经含有 NaCl 的提取溶液, 100ml 溶液为例: 将 4 克 NaCl 溶于 20ml 去离子水或蒸馏水中, 加入 60ml 甲醇, 然后加入去离子水或蒸馏水至 100ml。
- 充分振荡 3 分钟。
- 过滤样品 (Whatman 1) 并收集滤液。
为了使样品更具有代表性, 建议选择称取 50g 样品的方式。

6.3 干果

- 细细粉碎样品。
- 称取 5 g 粉碎后的样品。
- 添加 0.5 g NaCl。

- 添加 25 ml 80% 甲醇水溶液。注意: 可以制备已经含有 NaCl 的提取溶液。对于 100ml 溶液: 将 2 g NaCl 溶于 20 ml 去离子水或蒸馏水中, 加入 80ml 甲醇, 然后加入去离子水或蒸馏水至 100ml。
- 充分振荡 3 分钟。
- 过滤样品 (Whatman 1) 或以 3500xg 离心 5 分钟; 收集上清液 / 滤液。

6.4 DDGS

- 充分混匀待测样品。
- 细细粉碎样品。
- 称取 50 g 粉碎后的样品, 添加 250 ml 70% 甲醇水溶液。或者: 称取 5g 粉碎后的样品, 添加 25 ml 70% 甲醇水溶液。
- 充分振荡 15 分钟。
- 过滤样品 (Whatman 1) 并收集滤液。

如果样品浓度 >40 ppb, 用 70% 甲醇水溶液稀释 5 倍 (1 份滤液+4 份甲醇水溶液), 得到 5-200 ppb 的检测范围。

6.5 棉籽

- 充分混匀待测样品。
- 细细粉碎样品。
- 称取粉碎后的样品, 选择下表中描述的任一选项

样品量	NaCl	提取溶液
50 g	10 g	250 ml 70% 甲醇
50 g	/	250 ml 70% 甲醇, 4% NaCl*

*用 70% 甲醇 和 4% NaCl 制备提取溶液:

100 ml 溶液为例: 将 4g NaCl 溶解在 20ml 去离子水或蒸馏水中, 加入 70ml 甲醇, 然后加入去离子水或蒸馏水至 100ml.

- 充分振荡 3 分钟。
- 让样品沉淀分层, 收集上清液。或者将样品以 3500g 离心 5 分钟。
- 如果样品浓度 >5 ppb, 建议用 70% 甲醇稀释提取物 5 倍 (1 份提取物+4 份 70% 甲醇溶液) 并重复分析。
为了使样品更具有代表性, 建议选择称取 50g 样品的方式。

7 实验前的准备工作

黄曲霉毒素 B₁ 标准品: 即时使用, 使用前混匀。

酶耦合物: 即时使用。

洗涤缓冲液: 使用时用蒸馏水 1:10 稀释 (1 份洗涤缓冲液+9 份蒸馏水); 注意: 在晶体存在的情况下, 将溶液在室温下搅拌并完全溶解。

稀释的洗涤缓冲液在室温下稳定 24 小时, 在 2-8 °C 下稳定两周。

发展液: 即时使用; 溶液对光敏感, 应避光保存;

终止液: 即时使用; 注意: 包含 1 M 硫酸, 小心轻放, 如遇接触, 请用自来水彻底冲洗。

8 分析过程

8.1 初步准备

- 使用前将所有试剂置于室温，并在室温下保持至少 1 小时。
- 使用后应立即将剩余试剂放于 +2/+8 °C 环境中。
- 不要更改实验步骤，特别是：
 - 不要延长第一步的孵育时间；
 - 不要在高于 25°C 和低于 18°C 的环境中孵育微孔板；
 - 孵育期间不要摇动微孔板；
 - 使用精确的微量移液器和配套枪头。
- 一旦开始实验，应不间断的完成所有实验步骤。
- ELISA 结果的可重复性在很大程度上取决于洗涤微孔板的效率和均匀性；始终遵循说明书中的所述程序。
- 每个标准品和样品使用新的一次性吸头，以避免交叉污染。
- 不要让吸头接触微孔中已有的液体。
- **在所有孵育期间避免阳光直射。** 不能使用密封胶带覆盖微量滴定板。

8.2 分析步骤

1. 预先安排好实验流程，记录好每个标准品/样品的位置，如果条件允许，建议做平行实验。把未使用的微孔条放回原来有干燥剂的铝箔袋中。并密封好。同时也准备好同样数量无包被抗体的空白预混合孔。**注意：**建议在每次测定中不超过 48 孔（包括标准品）；如果不使用多道移液器，则建议在每次测定不超过 16 孔（包括标准品）。
2. 添加 100 µl 酶耦合剂到每个**预混合孔**。
3. 添加 50 µl 标准品/样品到相应的预混合孔中。标准品/样品含有高百分比的甲醇：在加入孔之前，注意冲洗吸管上下移液
4. 用微量移液枪，混合每个预混合孔的内容物（移液器上下三次），立即将 100ul 转移到相应的抗黄曲霉素 B1 抗体包被的微孔中。
注意：每个孔使用新的移液枪头，避免交叉污染。
5. 室温孵育 10 分钟；
6. 洗板
孵育结束后倒掉孔中的液体。
用稀释后的洗涤缓冲液填满微孔，倒掉微孔中的液体，**重复清洗步骤三次。**
将微孔板倒扣在吸水纸上并轻轻敲打，清除残留的液滴。
不要让微孔变干
7. 发展
添加 100 µl 发展液到每个微孔中，彻底混合几秒钟
8. 室温条件下孵育 5 分钟
9. 添加 50 µl 终止液到每个微孔中，并彻底混合几秒钟
10. 在 450 nm 处测定吸光度值，在 15 分钟内读数。

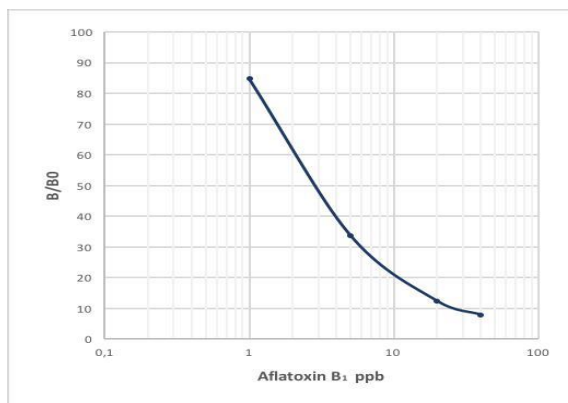
9 结果计算

将每个标准品/样品的吸光度值除以标准 0 (B0) 的吸光度并乘以 100；因此，最大结合 (B0) 等于 100%，吸光度值以百分比表示：

$$\frac{\text{标准品吸光度值(或样品)}}{\text{零标准品吸光度值}} \times 100 = \frac{B}{B_0} (\%)$$

- 根据每个标准品的 B/B0 值和黄曲霉素 B1 标准品浓度绘制标准曲线。
将每个样品的 B/B0 值插入校准曲线中得到相应浓度，标准品浓度 (ppb) 已经考虑了样品稀释因子。对于棉籽样品，如果提取物稀释 5 倍，则将所得浓度值乘以 5。

10 标准曲线示例



11 结果评估

在结果出具之后，有必要验证测定性能。通过将获得的数据与试剂盒中给出的数据进行比较来执行验证（第 12 段）。如果数值超出给定的规格，建议检查试剂盒的失效日期，吸光度记录的波长以及所用的程序。如果没有出现操作错误，请联系我们的技术支持。

12 试剂盒参数

12.1 分析参数

Bo 吸光度	≥ 0.7 OD _{450nm}
B/Bo 50%	1.6 – 4.6 ppb

12.2 分析性能

Matrix	浓度 ppb	回收率 %
玉米 (CRM)	2-90	92 ± 17
高粱 (spiked)	2.5-15	80 ± 8
玉米胚芽 (incurred)	10-20	79 ± 8
榛子 (incurred)	10	73 ± 4
杏仁 (spiked)	2.5-15	100±10
花生 (spiked)	2.5-15	113 ± 8
葡萄干 (spiked)	5-10	78 ± 10
大豆 (spiked)	2.5-15	97 ± 6
豆粕 (spiked)	10-30	106± 10

基质	Cut off - ppb	LOQ- ppb
玉米	≤ 1	1
高粱	≤ 1	ND
坚果	≤ 1	ND
干果	≤ 1	2
豆粕	2.5	5

13 参考文献

Rosar G., Puppini B., Bassani V., Persic L. Monitoring the performances of Tecna's ELISA test kits for mycotoxins through proficiency test participation. Poster presentation at 7th International Symposium on Recent Advances in Food Analysis, 2015, November 3-6, Prague, Czech Republic.

Huybrechts, B. Evaluation of immunoassay kits for aflatoxin determination in corn and rice. 2011 CODA-CERVA publication.

G. Rosar, L. Persic, F. Gon, B. Puppini, V. Bassani, F. Diana. Analysis of mycotoxins in complex matrices by enzyme immunoassays. Poster presentation at 35th Mycotoxin Workshop, 2013, 22-24 May, Ghent, Belgium

F. Gon, G. Rosar, E. Paoluzzi, F. Diana. Mycotoxin poly-contamination in maize: fast and sensitive ELISA test kits for a multi-analytical screening. Poster presentation at RME 2013, 21-23 January, Noordwijkerhout, the Netherlands.

Diana, F., Bacer, V., Puppini, B., Persic, L. E Paleologo, M. Celer AFLA B1: a rapid and practical ELISA for Aflatoxin B1 determination in foodstuffs. 3rd National Congress. Mycotoxins in agri-food chain. Istituto Superiore di Sanità. Rome, September 28-30, 2009. Proceedings: Rapporti ISTISAN 10/32, pag. 197-203

14 责任

使用试剂盒评估为阳性的样品必须用确认方法重新测试。

Tecna 对由于不正确使用该试剂盒而导致的任何客户损失以及因结果而采取的任何行动不承担任何责任。

Tecna 对现行欧洲安全法规中对该试剂盒的不安全使用不承担任何责任。

Celer[®] is a registered trademark in Italy by Tecna S.r.l.