



酶联免疫法检测玉米赤霉烯酮

Celer[®] ZEA 是用于玉米赤霉烯酮定量分析的酶联免疫试剂盒，该试剂盒包含 96 孔或 48 孔测试所需的试剂，包括标准品。
需要实验室配备酶标仪。

检测范围

谷物、饲料、DDGS.

样品前处理

研磨、甲醇水提取、过滤

检测时间

20 分钟 (不包括样品前处理时间).

检测限

10 ppb.

特异性	
化合物	交叉反应率 (%)
玉米赤霉烯酮	100
α - 玉米赤霉烯醇	65±9
玉米赤霉酮	26±2
α - 玉米赤霉醇	12±2
β - 玉米赤霉烯醇	9±1
β - 玉米赤霉醇	5±1

1 检测原理

该测定在已用抗玉米赤霉烯酮抗体包被的微孔中进行。在预混孔中，将酶标记的玉米赤霉烯酮和标准溶液或样品混合，然后转移到包被有抗玉米赤霉烯酮抗体的微孔板中。在孵育过程中，游离的玉米赤霉烯酮和酶标记的玉米赤霉烯酮竞争固相上的抗玉米赤霉烯酮抗体结合位点。然后在洗涤步骤中除去任何未结合的酶耦合物和玉米赤霉烯酮分子。通过添加固定量的底物，将无色的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品/样品中的玉米赤霉烯酮浓度成反比。

2 提供的试剂

预混微孔板: 未包被的空白孔

微孔板: 包被有抗玉米赤霉烯酮抗体的微孔板，置于装有干燥剂的铝箔袋中；

微孔板可独立拆分，单独使用。

玉米赤霉烯酮标准品: 5 瓶 1.5ml 标准溶液，浓度分别为 0 ppb; 10 ppb; 50 ppb; 400 ppb; 1000 ppb.

酶耦合物: 1 瓶液体

96 孔: 14ml;

48 孔: 8ml.

洗涤缓冲液 10x: 1 瓶, 50 ml.

发展液: 1 瓶

96 孔: 14ml;

48 孔: 8ml.

终止液: 白色盖子的玻璃瓶

96 孔: 8ml;

48 孔: 6ml.

3 需准备的材料 (未提供)

- 氯化钠 (谷物、饲料)
- “霉菌毒素提取液 A” 或 70% 甲醇
- 去离子水或蒸馏水.

设备

- 天平.
- 研磨机
- 提取 (可选): 振荡器.
- 滤纸 (Whatman 1), 漏斗.
- 20-200 μ l, 100-1000 μ l 微量可调移液器及配套枪头.
- 50-300 μ l 多通道微量可调移液器及配套枪头.
- 酶标仪: 450 nm

4 注意事项

- 仅用于体外诊断;
- 有些试剂含有防腐剂. 终止液包含硫酸有腐蚀性, 标准溶液中含有甲醇而易燃.
- 小心处理试剂, 避免接触皮肤, 眼睛和黏膜.
- Tecna 网站提供安全数据表.

5 处理和存储说明

- 在 2-8 $^{\circ}$ C 存储试剂盒, 不要冷冻.
- 将未使用的微孔板放回装干燥剂的铝箔袋中.
- 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 样品前处理

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	氯化钠	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
- 滤液用于测定
- 如果样品中的玉米赤霉烯酮含量 > 1000 ppb ,用 70% 甲醇溶液稀释 5 倍 (1 份样品+4 份 70% 甲醇溶液), 以获得 50 -5000 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

6.2 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 5 g 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
- 滤液用于测定
- 如果样品中的玉米赤霉烯酮含量大于 1000 ppb ,用 70% 甲醇溶液稀释 5 倍 (1 份样品+4 份 70% 甲醇溶液), 以获得 50 -5000 ppb 的检测范围.

对于高度污染的样品, 建议重复进行分析, 将提取时间延长至 60 分钟, 以获得更好的准确度.

7 实验前的准备工作

玉米赤霉烯酮标准品: 即时使用, 使用前混匀

酶耦合剂: 即时使用

洗涤缓冲液: 使用时用蒸馏水稀释缓冲液 1:10 (1 份缓冲液 + 9 份蒸馏水)

注意: 在晶体存在的情况下, 将溶液置于室温下搅拌至完全溶解

稀释的洗涤缓冲液在室温下保存 24 小时, 在 2-8 $^{\circ}$ C 下保存两周

发展液: 即时使用; 试剂对光敏感, 避光保存;

终止液: 即时使用; **注意**: 终止液包含 1M 硫酸, 小心轻放, 如果接触, 请用自来水彻底清洗

8 检测步骤

8.1 实验前注意事项

- 使用前将所有试剂放置室温下, 至少回温一小时.
 - 使用后应立即将剩余试剂放回 2-8 $^{\circ}$ C 保存.
- 不要更改实验流程, 特别是:
- 不要延长第一步的孵育时间;
 - 请勿在高于 25 $^{\circ}$ C 或低于 18 $^{\circ}$ C 的温度下孵育微孔板;
 - 孵育期间不要摇动微孔板;
 - 使用精确的移液器
 - 一旦开始实验, 连续完成所有操作步骤, 不可中断.
 - ELISA 结果的可重复性在很大程度上取决于微孔洗涤的效率和均匀性; 始终遵循所述的操作步骤.
 - 每次加样使用新的加样头, 避免交叉污染.
 - 加样头不要接触微孔内的液体.
 - **孵育期间避免阳光直射**, 建议在不使用密封胶带的情况下覆盖微孔板.

8.2 分析步骤

- 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，并用夹子夹好；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）
- 分别添加 100 μ l 酶耦合物到每个**预混合孔**中。
- 分别添加 50 μ l 标准品/样品到相应的预混合孔中，
- 使用微量移液枪，混合每个预混合孔的内容物（移液器上下吸取三次），立即将 100 μ l 转移到相应的抗玉米赤霉烯酮抗体包被的微孔中。
注意：每次使用新的加样头，避免交叉污染。
- 室温孵育 10 分钟；
不要延长第一步的孵育时间，孵育过程中不要振动。
- 洗板
 - 孵育结束后，倒掉孔中的液体
 - 将洗涤缓冲液完全填满微孔，倒掉微孔内的液体。
重复洗涤程序三次。
 - 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。
- 添加 100 μ l 发展液到每个微孔中，彻底混合几秒钟
- 室温下孵育 10 分钟
- 添加 50 μ l 终止液到每个微孔中，并彻底混合
- 在 450 nm 处测定吸光度值. 在 15 分钟内读数

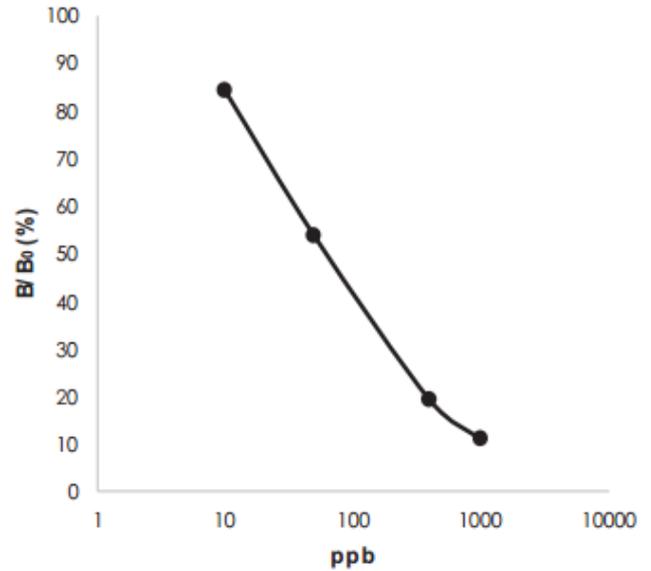
9 结果计算

- 将每个标准品和样品的吸光度值除以标准 0 (B_0) 的吸光度并乘以 100；因此，最大结合 (B_0) 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/B_0 值和玉米赤霉烯酮标准品浓度绘制标准曲线。
- 将每个样品的 B/B_0 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。
- 如果样品稀释 5 倍（检测范围为 50-5000ppb），则将样品浓度值乘以 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。如果值超出给定的数据，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 吸光度值	≥0.7 OD _{450nm}
B/B ₀ 50%	48 - 141 ppb

12.2 分析性能

基质	Cut off (ppb)	LOQ (ppb)
玉米	<10	20
小麦	18	25
饲料	40	50
DDGS	90	ND

13 责任

使用试剂盒评估为阳性的样品必须使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。