黄曲霉毒素 B1 检测试剂盒
使用说明书

（酶联免疫法）

1 原理及用途

本试剂盒采用间接竞争 ELISA 方法检测谷物、饲料等样本中的黄曲霉毒素 B1（Aflatoxin B1，**AFB1**），试剂盒由预包被偶联抗原的酶标板、辣根酶标记物、抗体、标准品及其他配套试剂组成。检测时，加入标准品或样本溶液，样本中的黄曲霉毒素 B1 和酶标板上预包被偶联抗原竞争抗黄曲霉毒素 B1 抗体，加入酶标记物后，用 TMB 底物显色，样本吸光度值与其所含黄曲霉毒素B1含量成负相关，与标准曲线比较即可得出样本中黄曲霉毒素B1的残留量。

2 技术指标

2.1 试剂盒灵敏度：**0.01ppb(ng/ml)**

2.2 反应模式：**25℃，30min～15min**

2.3 检测下限：

谷物……0.06ppb

玉米皮、麸皮等吸水性强样本……0.2ppb

食用油、花生油……0.2ppb

酱类、饼干、糕点等食品或调料……0.2ppb

啤酒……0.1ppb

葡萄酒、酱油、醋……0.05ppb

茶叶……0.06ppb

麦类……0.4ppb

2.4 交叉反应率：

黄曲霉毒素 B1……100%

2.5 样本回收率：

谷物……85±15%

花生油……82±15%

食用油……85±15%

酱类、饼干、糕点等食品或调料…83±15%

啤酒……84±15%

葡萄酒、酱油、醋……87±15%

茶叶、麦类……75±15%

3 试剂盒组成

酶标板……48孔/96孔

标准品：各 1ml

0ppb、0.01ppb、0.03ppb、0.09ppb、0.27ppb、0.81ppb

高标准品：100ppb ……1ml

酶标记物……3ml/5.5ml

抗体工作液……3ml/5.5ml

底物液 A……6ml

底物液 B……6ml

终止液……6ml

20×浓缩洗涤液……40ml

说明书 ……1 份

盖板膜……1 张

自封袋……1 个

4 需要的器材和试剂

4.1 仪器：酶标仪、打印机、均质器、氮气吹干装置、振荡器、离心机、恒温培养箱、天平（感量 0.01g）

4.2 微量移液器：单道 20μl-200μl、100μl-1000μl，多道 300μl

4.3 试剂：甲醇、正己烷、三氯甲烷

5 样本前处理

5.1 样本处理前须知：

实验器具必须洁净并使用一次性吸头，以避免污染干扰实验结果。

5.2 配液：

配液 1：样本提取液

70%甲醇，即 V 甲醇：V 去离子水=7：3。

配液 2：工作洗涤液

将 20×浓缩洗涤液 20 倍稀释(1 份 20×浓缩洗涤液加 19 份去离子水)。

配液 3：样本复溶液

35%甲醇，即 V 甲醇：V 去离子水=3.5：6.5。

5.3 样本前处理步骤：

5.3.1 谷物处理方法

1）称取 2g±0.05g 粉碎样本于 50ml 离心管中，加 4ml 甲醇，振荡 5 分钟，室温 4000 转/分离心 10 分钟；

2）取 0.3ml 上清，加入 0.6ml 去离子水，振荡 30 秒，室温 4000 转/分离心 5 分钟；

3）取 50μl 进行分析。

样本稀释倍数：6　　检测下限：0.06ppb

5.3.2 玉米皮、麦麸等吸水性强样本处理方法

1）称取 2g±0.05g 粉碎样本于 50ml 离心管中，加 20ml 样本提取液（配液 1），振荡 5 分钟，室温 4000 转/分离心 10 分钟；

2）取 0.5ml 上清，加入 0.5ml 去离子水，混匀；**（对于毒素含量极高的样本可用样本复溶液（配液 3）稀释后再测。比如取 2）中的混合液 0.1ml 加 0.9ml 样本复溶液（配液 3）混匀，最终样本稀释倍数为 200，检测下限为 2ppb。）**

3）取 50μl 进行分析。

样本稀释倍数：20　　检测下限：0.2ppb

注：由于毒素在样本中的分布呈非均匀状态，取样时需多点取样充分混匀后再取 2g 进行试验。

5.3.3 食用油、花生油处理方法

1）称取 2ml 样本于 50ml 离心管中，加 8ml 正己烷和 10ml 样本提取液（配液 1），振荡 5 分钟，室温 4000 转/分离心 10 分钟；

2）去除上层液体，取 0.5ml 下层液体加入 0.5ml 去离子水，混匀，再取混匀液体 0.5ml 加入 0.5ml 样本复溶液（配液 3），振荡 30s；

3）取 50μl 进行分析。

样本稀释倍数：20　　检测下限：0.2ppb

5.3.4 酱类、饼干、糕点等食品或调料处理方法

1）称取 1g±0.05g 粉碎样本至 15ml 离心管中，加 10ml 甲醇，振荡 5 分钟，室温 4000 转/分离心 5 分钟；
2）取 2ml 上清至 15ml 离心管中，于 50℃-60℃下氮气或空气吹干；
3）加入 2ml 去离子水，振荡 30s，再加入 6ml 三氯甲烷，振荡 5 分钟，室温 4000 转/分离心 5 分钟；
4）取下层三氯甲烷液 1.5ml 至 10ml 离心管，于 50℃-60℃下氮气或空气吹干；
5）加入 0.5ml 正己烷，振荡 30s，再加入 1ml 样本复溶液（配液 3），振荡 1 分钟，室温 4000 转/分离心 5 分钟；
6）去除上层有机物相，取下层清液 50μl 分析。

样本稀释倍数：20　　检测下限：0.2ppb

5.3.5 啤酒处理方法

1）将啤酒充分搅拌（去除二氧化碳），取 2ml 啤酒样本，加入 1ml 蒸馏水，再加入 7ml 甲醇，振荡 5 分钟；
2）取混匀后的样本液 0.5ml 加入 0.5ml 去离子水，混匀；
3）取 50μl 进行分析。

样本稀释倍数：10　　检测下限：0.1ppb

5.3.6 葡萄酒、酱油、醋处理方法

1）取 2ml 样本，加入 2ml 蒸馏水，再加入 10ml 三氯甲烷，振荡 5 分钟，室温 4000 转/分离心 10 分钟；
2）取下层液体 1ml 于 50-60℃下氮气或空气下吹干；
3）加入 0.5ml 样本提取液（配液 1）充分溶解干燥物，再加入 0.5ml 去离子水，混匀；
4）取 50μl 进行分析。

样本稀释倍数：5　　检测下限：0.05ppb

5.3.7 茶叶处理方法

1）称取 2g±0.05g 粉碎样本于 50ml 离心管中，加 4ml 甲醇，振荡 5 分钟，室温 4000 转/分离心 10 分钟；
2）取 0.3ml 上清，加入 0.6ml 去离子水，混匀；
3）取 50μl 进行分析。

样本稀释倍数：6　　检测下限：0.06ppb

5.3.8 麦类处理方法

1）称取 1g±0.05g 粉碎样本于 50ml 离心管中，加入 2ml 样本提取液（配液 1），振荡 5 分钟，室温 4000 转/分离心 10 分钟；
2）取 0.2ml 上清，加入 0.2ml 去离子水，振荡 30 秒，室温 4000 转/分离心 5 分钟；
3）取离心后的样本液 0.1ml 加入 0.9ml 样本复溶液（配液 3），混匀。
4）取 50μl 进行分析。

样本稀释倍数：40　　检测下限：0.4ppb

6 酶联免疫试验步骤

将所需试剂从 4℃冷藏环境中取出，置于室温平衡 30min 以上，洗涤液冷藏时可能会有结晶需恢复到室温以充分溶解，每种液体试剂使用前均须摇匀。取出需要数量的微孔板及框架，将不用的微孔板放入自封袋，保存于 2-8℃。

6.1 **编　　号：**将样本和标准品对应微孔按序编号，每个样本和标准品做 2 孔平行，并记录标准孔和样本孔所在的位置。

6.2 **加样反应：**加标准品或样本 50μl/孔到各自的微孔中，然后加酶标记物 50μl/孔，再加入 50μl/孔的抗体工作液，用盖板膜封板，轻轻振荡 5 秒混匀，25℃反应 30 分钟。

6.3 **洗　　涤：**小心揭开盖板膜，甩去孔内液体，每孔加 350μl **工作洗涤液**，静置 30 秒后弃去，重复洗涤 5 次，最后一次拍干（用吸水纸拍干，拍干后未被清除的气泡可用干净的枪头刺破）。

6.4 **显　　色：**每孔加入底物液 A 50μl，再加底物液 B 50μl，轻轻振荡 5 秒混匀，25℃避光显色 15 分钟（若蓝色过浅，可适当延长反应时间）。

6.5 **终　　止：**每孔加入终止液 50μl，轻轻振荡混匀，终止反应。

6.6 **测吸光值：**用酶标仪于 450nm 处测定每孔吸光度值（建议用双波长 450/630nm）。测定应在终止反应后 10 分钟内完成。

7 结果分析

7.1 百分吸光率的计算

标准品或样本的百分吸光率等于标准品或样本的百分吸光度值的平均值（双孔）除以第一个标准品（0ppb）的吸光度值，再乘以 100%，即

$$\text{百分吸光率（\%）} = \frac{A}{A0} \times 100\%$$

A—标准品或样本溶液的平均吸光度值

A0—0ppb 标准品的平均吸光度值

7.2 标准曲线的绘制与计算

以标准品百分吸光率为纵坐标，对应的标准品浓度（ppb）的对数为横坐标，绘制标准品的半对数曲线图。将样本的百分吸光率代入标准曲线中，从标准曲线上读出样本所对应的浓度，乘以其对应的稀释倍数即为样本中待测物的实际浓度。

若利用试剂盒专业分析软件进行计算，更便于大量样本的准确、快速分析。（欢迎来电索取）

8 注意事项

8.1 室温低于 25℃或试剂及样本没有回到室温（25℃）会导致所有标准的 OD 值偏低。

8.2 在洗板过程中如果出现板孔干燥的情况，则会出现标准曲线不成线性，重复性不好的现象。所以洗板拍干后应立即进行下一步操作。

8.3 混合要均匀，洗板要彻底，在 ELISA 分析中的再现性，很大程度上取决于洗板的一致性。

8.4 在所有孵育过程中，用盖板膜封住微孔板，避免光线照射。

8.5 不要使用过了有效期的试剂盒，不要交换使用不同批号试剂盒中的试剂。

8.6 显色液若有任何颜色表明变质，应当弃之。0 标准的吸光度值小于 0.5 个单位（A450nm< 0.5 ）时，表示试剂可能变质。

8.7 反应终止液有腐蚀性，避免接触皮肤。

9 贮藏及保存期

储藏条件：试剂盒于 2-8℃保存，避免冷冻。

保 质 期：该产品有效期为 1 年，生产日期见包装盒。