



腹泻性贝类毒素 (DSP) ELISA 检测试剂盒使用说明书

PN 520021

(中文说明书仅供参考, 应以英文说明书为准)

1. 概述

腹泻性贝类毒素检测试剂盒的原理是酶联免疫吸附测定法, 用于水及水产品中腹泻性贝类毒素的定量测定。冈田酸是腹泻性贝类毒素的一种。对于水产品需要做前处理, 不可以直接检测。如果需要的话阳性样品可以通过 HPLC 和 GC/MS 来验证。

2. 安全性说明书

试剂盒中的标准溶液里含有少量的冈田酸。底物中包含有四甲基联苯胺, 终止液中含有稀硫酸。要避免皮肤和粘膜与终止液接触, 如果不小心接触了请马上用水冲洗。

3. 保存和稳定性

试剂盒应保存在 2-8℃, 不要冷冻。在使用之前要把试剂盒中的溶液恢复到室温 (20-25℃)。有效期内试剂盒中的试剂都可以使用。

4. 原理

试剂盒的原理是直接竞争 ELISA 法, 通过特异性抗体来识别冈田酸。当样品中含有冈田酸时, 样品中的冈田酸与冈田酸酶结合物竞争结合溶液中的冈田酸抗体。冈田酸抗体与包被在微孔板上的羊抗鼠二抗结合。经过一步洗涤加入底物溶液, 产生有色反应。产生的绿色的颜色深度与样品中冈田酸的含量成反比。加入反应停止液后使颜色由蓝色转变为黄色。用酶标仪在 450nm 处测定吸光度值。通过绘制标准曲线来计算样品中冈田酸的含量。

5. 冈田酸试剂盒的局限性和可能的干扰

对在水样中经常出现的多种有机物和无机物已近作过检测对此试剂盒并无干扰。由于化合物的易变质性由基质反应引起的干扰是不可能完全避免的。操作不当也可能导致检测结果错误, 比如: 试剂盒保存条件不对、错误的加液顺序、试剂的量没有加准确、孵育的时间太长或太短、孵育的温度太高或太低。与其它检测方法一样对阳性结果要求通过其它传统的方法来验证。

6. 冈田酸测定的重要性

冈田酸是腹泻性贝类毒素的一种, 受冈田酸污染的贝类和有害藻类大量繁殖的有关。DSP 可以引起剂量依赖型的腹泻、恶心、呕吐症状。FDA 对 ASP 的限量是 0.2ppm。欧洲是 160ug。这个试剂盒可以检测 40 个样品 (做两个重复)。需要少量的样品, 检测时间少于 2 小时。

7. 试剂盒特性

敏感性: 0.1ng/ml

重复性: 标准的变异系数小于 10%, 样品的变异系数小于 15%

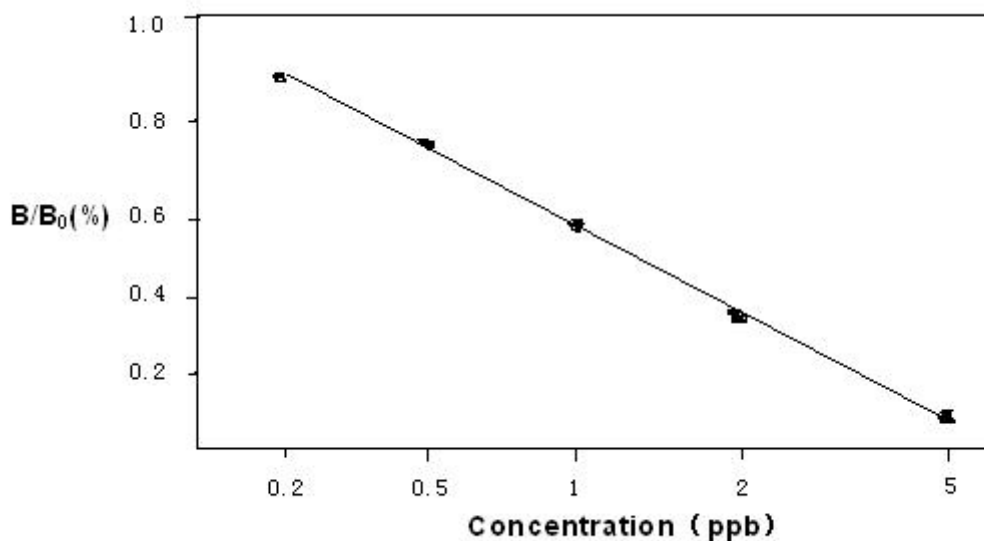
特异性:

腹泻性贝类毒素检测试剂盒能检测 Okadaic acid 及其它 DSP, 它们的结合程度是不同, 以下表格中展示的是相关值及交叉反映率 (%CR), 以下所有浓度均为 ppb 级。

种类	% CR	种类	% CR
Okadaic Acid (DTX)	100%	Dinophysistoxins DTX-2	50%
Dinophysistoxins DTX-1	50%		

样品: 水样和贝类产品

标准曲线:



A. 试剂盒组成:

- 1、包被二抗的微孔板 (羊抗兔)
- 2、标准 (7 种) 0、0.1、0.2、0.5、1.0、2.0、5.0、ng/ml
- 3、冈田酸抗体溶液 (兔抗冈田酸) 6ml
- 4、冈田酸酶标记物 6ml
- 5、样品稀释液 (10 倍浓缩) 25ml, 用于稀释样品
- 6、5x 浓缩洗液 100ml
- 7、显色液 (底物) TMB, 16ml
- 8、终止液 12ml



B 测试前准备

微量移液器和吸头是必须使用的，推荐使用排枪加液这样可以确保整个微孔板上的孔在每个步骤的反应时间趋于一致。在做同一次测试时要使用同一个盒子里的试剂和标准。在操作前仔细阅读说明书。

- 1、使用前将所有的试剂拿到室温（19°C-25°C）。
- 2、从铝箔袋中拿出要求数量的微孔条，放入干燥剂并重新封好袋子以免微孔条受潮。置于4-8°C保存。
- 3、标准液，对照，酶结合物，底物，终止液不用稀释直接使用。
- 4、洗液在使用前要以1：5的比例稀释后使用（100 mL 5X 洗液加 400 mL 无离子水）
- 5、由于终止液中含稀硫酸拿的时候要小心。

C. 操作步骤

- 1、在对应的微孔中加入100 μ L的标准和样品（推荐做2-3个重复）
- 2、每个测试孔都加入50 μ L冈田酸酶标记物溶液。
- 3、每个测试孔都加入50 μ L冈田酸抗体溶液，用封口膜把微孔板盖上，轻轻的震荡微孔板30秒使里面的液体混匀。不要使液体洒出。
- 4、在室温下孵育60分钟。
- 5、孵育完成后，把封口膜取掉，将微孔中的溶液用力地倒入水槽中，用1 X的洗液洗板3次，每孔每次至少加入250 μ L 1 X的洗液。拍板，去掉残留的洗液。
- 6、每个测试孔加入150 μ L的显色液（底物）。室温孵育20-30分钟，此步骤避免太阳光照射。
- 7、每个测试孔加入100 μ L终止液。
- 8、用酶标仪在450nm 下读取每个孔的吸光度值（OD）（在加入终止液15分钟内完成）。

D 结果分析

结果分析可以利用商业ELISA分析软件(4-parameters, Logit/Log)。手工计算可以先计算标准的吸光度值的平均值，然后计算每个标准的%B/B0（用其它标准的吸光度值除以零标准的吸光度值乘以100%）。以每个标准的%B/B0做Y轴，以每个标准的冈田酸的浓度做X轴构建标准曲线。通过利用标准曲线，把样品的%B/B0代入标准可以计算出样品中冈田酸的浓度。样品中冈田酸的含量小于0.1 ppb认为阴性。当样品中冈田酸的含量大于5.0 ppb要稀释后再测定。

E 试剂盒未提供的材料

- 1、10-200 μ l和200-1000 μ l的移液器及吸头。
- 2、10-250 μ l多道移液器及吸头。
- 3、酶标板洗板仪（可选）
- 4、450nm的酶标仪。
- 5、酶标板震荡仪（可选）

F. 工作计划

微孔板由12条构成，每条8孔。在测试中可以单独使用。每次检测都必须做标准。

Std0-Std6: 标准 0; 0.1; 0.2; 0.5; 1.0; 2.0; 5.0ppb

Sam1, Sam2, etc.: Samples

	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12
A	Std0	Std4	etc									
B	Std0	Std4	etc									
C	Std1	Std5										
D	Std1	Std5										
E	Std2	Std6										
F	Std2	Std6										
G	Std3	Sam1										
H	Std3	Sam1										

G. 样品制备

肌肉样品:样品应当保存在阴凉避光之处及冷藏保存

1. 除去贝壳，用双蒸水洗净贝肉后均质器均质。
2. 称取 1g 均质后的样品加入 6ml 80%的甲醇(甲醇 80: 蒸馏水 20)
3. 离心: 3500g 离心 10 分钟，收集上清液。
4. 加 2ml80%的甲醇(甲醇 80: 蒸馏水 20)到上步骤中的残留贝肉组织中再离心: 4℃下，3500g 离心 10 分钟，收集上清液，加入到步骤 3 收集的上清液中。
5. 重复步骤 4 待收集的上清液达到 10ml 时，用 0.45um 的滤膜过滤。
6. 取 100ul 滤液，用样品稀释缓冲液稀释到 1ml(10 倍稀释)
7. 取 100ul 用试剂盒进行分析，此时的稀释倍数是 100。

注意: 如样品中含量低可以将稀释倍数降低，例如 25 倍。如样品含量很高可以将稀释倍数加大，如 1000 倍。只需要在第 6 部稀释过程改变就可以。