

β-N-甲基氨基-L-丙氨酸 (BMAA) 检测试剂盒

PN 520040

(请以英文为准, 中文仅供参考)

概述

这个Abraxis β-N-甲基氨基-L-丙氨酸 (BMAA) ELISA检测试剂盒适用于定量检测水样中β-N-甲基氨基-L-丙氨酸 (BMAA) 的含量。本试剂不适用于临床诊断。

安全性说明

试剂盒中的标准溶液含有少量的 BMAA。另外, 底物溶液含有四甲基联苯胺, 终止溶液含有稀硫酸。要避免皮肤和底物溶液、终止液接触。如果不小心接触的话请用清水冲洗。

储存和稳定性

这个Abraxis β-N-甲基氨基-L-丙氨酸 ELISA 检测试剂盒应该置于4-8°C保存。在使用前要提前拿出来恢复到室温(20-25°C)。在有效期内都可以使用。

原理

这个Abraxis β-N-甲基氨基-L-丙氨酸 ELISA 检测试剂盒是基于通过特异性抗体识别BMAA的直接竞争酶联免疫反应。当样品中含有β-N-甲基氨基-L-丙氨酸时, 并且BMAA-HRP类似物竞争兔抗BMAA的结合位点抗体在溶液中, 然后将BMAA抗体与第二抗体(山羊抗兔)固定在微量滴定板的孔上。在洗涤步骤和加入底物溶液后, 产生了一个颜色反应。加入反应终止液后使颜色由蓝色变为黄色; 在450nm波长进行检测, 样品中的β-N-甲基氨基-L-丙氨酸浓度与吸收光强度成反比。

试剂盒的局限性和可能的交叉反应

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。发现以下物质的存在对 BMAA 试剂盒没有显著影响: 硫酸锰和氧化铝高达 10,000ppm;氯化钙和硫代硫酸钠可达 1000PPM;磷酸钾, 硫酸亚铁和硫酸锌至 100ppm;氯化铜, 硫酸钙, 硫酸镁, 氟化钠和硝酸钠至多 10ppm;氯化钠最高至 1 ppm;胡敏酸和氯化镁高达 0.1 ppm;甲醇达 1%;和海水高达 10%。操作不当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。操作过程不易在强光下进行。和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。

测定的重要性

β-N-甲基氨基-L-丙氨酸 (BMAA) 是由几种类型的蓝细菌产生的非蛋白质氨基酸。当摄入时, BMAA 会破坏并最终破坏运动神经元导致 ALS 患者出现相同类型的损伤, 并引起脊髓神经原纤维缠结脐带和脑, 类似于阿尔茨海默病中所见。那些遭受这种 BMAA 引起损害的人是归类为患有肌萎缩侧索硬化/帕金森综合征痴呆综合征 (ALS / PDC)。症状 ALS / PDC 包括 ALS 的肌肉麻痹程度, 帕金森病的肌肉僵硬程度和阿尔茨海默病痴呆并最终导致死亡。通过摄入受污染的饮用水或食物, 人类可能会接触 BMAA。饮用水可能通过在饮用水源中产生 BMAA 的蓝细菌的增殖而被 BMAA 污染,如湖泊和水库。目前还不清楚水处理的各种方法是否能够去除 BMAA 来自饮用水供应。暴露也会彻底摄入诸如苏铁种子等植物的食物, 已知 BMAA 的蓝细菌生活并因此污染植物及其种子, 并通过植物摄入食用含有植物或蓝藻的毒素的鱼类或其他动物。这是一个例子,20 世纪 50 年代关岛出现了生物放大, 当时食用苏铁种子的果蝠被原籍查莫罗人



食用引起 ALS / PDC 病例急剧增加，在关岛被称为“裂解物”。BMAA ELISA 允许重复测定42个样品的分析。少于 1 毫升的样本是必需的。测试可以在大约 2 小时内完成。

性能数据

灵敏度：BMAA (95%B/B0) 的定量限为约4 ng / mL。 中间的测试 (50%B/B0) 约为100ng / mL。 确定更接近中间的校准曲线给出最准确的结果。样品浓度可以针对需要下限的样品进行检测(可根据要求从Abraxis 获得技术公告)。

测试重复性：标准的变异系数 (CV) : <10%; 样本的CV: <15%。

特异性：Abraxis BMAA ELISA对相关化合物的交叉反应性：

β -N-甲基氨基-L-丙氨酸 (BMAA) 100%

L-半胱氨酸盐酸盐 0.2%

L-谷氨酸 0.2%

L-天冬氨酸 0.2%

γ-氨基丁酸 0.02%

DL-2,4-二氨基丁酸二盐酸盐0.01%

与甘氨酸，L-异亮氨酸，L-赖氨酸一盐酸盐，L-组氨酸单盐酸盐一水合物，L-色氨酸，L-丙氨酸，L-酪氨酸，L-缬氨酸，L-胱氨酸，L-天冬酰胺，L-苯丙氨酸，L-苏氨酸，L-脯氨酸，L-精氨酸单盐酸盐，L-谷氨酰胺，L-甲硫氨酸，反式-4-羟基-L-脯氨酸，L-丝氨酸和L-苏氨酸，亮氨酸高达1 μ g / mL。

Microcystin-LR和Cylindrospermopsin的交叉反应率不超过0.1 μ g / mL。

A 试剂盒组成

- 1、96孔酶标板：1块 (12×8条)，包被有羊抗鼠二抗。
- 2、冻干的标准品：6瓶，浓度分别为0, 5,25, 100, 250, 500 ng/mL (ppb)使用前请参阅测试准备 (D部分)
- 3、3、抗体溶液 (兔抗BMAA)，6mL
- 4、BMAA-HRP酶标记物，6mL
- 5、洗液 5X Concentrate,，100mL
- 6、底物显色液 (TMB)，16mL
- 7、终止液，12mL
- 8、样品稀释液，25mL

B 剂盒未提供的材料

- 1、50-250ul 的移液器及吸头。
- 2、50-250ul 八道移液器及吸头。
- 3、450nm 的酶标仪
- 4、蒸馏水
- 5、吸水纸
- 6、计时器
- 7、封口膜

C. 样品收集

用聚丙烯 (PP) 或高密度聚乙烯 (HDPE) 来收集容器中的水样。不要使用玻璃容器，因为分析物会因吸附而丢失。

D. 测试准备

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. 抗体溶液，酶结合物，底物，终止液不用稀释直接使用。
4. 标准品以冻干形式提供。使用时，每个小瓶加入1 mL去离子水或蒸馏水，振荡混匀，低温下可保存1个月（冷藏）。
5. 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）
6. 由于终止液中包含稀硫酸拿的时候要小心。

E. 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。

Std 0-Std 5: Standards

(0; 5; 25; 100; 250; 500 ppb)

Samp1, Samp2, etc.: Samples

	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12
A	Std 0	Std4	etc									
B	Std 0	Std4	etc									
C	Std 1	Std5										
D	Std 1	Std5										
E	Std 2	Sam1										
F	Std 2	Sam1										
G	Std 3	Sam2										
H	Std 3	Sam2										

F. 操作步骤

- 1、在对应的微孔中加入100 μL的标准和样品（推荐做2-3个重复）
- 2、每个测试孔都加入50 μL酶标记物溶液。
- 3、每个测试孔都加入50 μL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90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4次，每孔每次至少加入250 μL 1 X的洗液。拍板，去掉残留的洗液。
- 6、每个测试孔加入150μL的显色液（底物）。室温孵育30分钟，此步骤避免太阳光照射。
- 7、每个测试孔加入100μL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）。

G. 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BMAA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BMAA的浓度。样品中BMAA的含量小于1 ppb认为阴性。当样品中BMAA的含量大于500 ppb要稀释后再测定。

H. 标准曲线

