



# 神经性贝毒 (NSP) ELISA 检测试剂盒

PN 520034

(中文说明书仅供参考请以英文为准)

## 1. 说明

本检测采用酶联免疫法定量检测神经性贝毒的存在。神经性贝毒是一种毒素，与贝壳类动物的神经中毒有关。本检测可用于水产样本对贝类毒素的定性和定量检测，例如甲壳类动物的样本。对于甲壳类动物的需要提前制备样本。如果条件允许，阳性样本可以做 HPLC，GC/MS 或其他方法确认。

## 2. 安全性说明

标准品溶液含有少量的神经性贝毒。底物溶液含有四甲基联苯胺，终止液还有稀硫酸。避免皮肤与粘膜与终止液接触。若终止液与皮肤接触，可用水洗去。

## 3. 贮藏与稳定性

试剂盒贮存在 4-8° C。使用前试剂盒中溶液要恢复到室温 20—25 度。在保质期内试剂盒都可以正常使用。

## 4. 检测原理

本实验采用直接竞争 ELISA 方法，用特异性抗体识别神经性贝毒。样本中的神经性贝毒可与贝毒-酶-结合物竞争，同包被在微孔板上的羊抗-神经性贝毒抗体结合。洗板加入底物溶液，显蓝色。蓝色的深度与神经性贝毒在样本中的浓度成反比。颜色反应在规定时间内终止，颜色用酶标仪读值。每孔的样本浓度值可以通过标准曲线来读取。

## 5. 试剂盒局限性和可能的干扰

样本中经常存在的大量的无机物和有机物经检测，并未为发现影响试剂盒的检测结果。然而，由于样本中发现有易变质的混合物，由它们引起的基质反应不可避免地会影响检测结果。操作失误也可能造成实验错误。如：贮存的问题。加样次序错误，加入溶液的体积错误，孵育的时间过长或者过短，影响免疫反应或者底物反应，实验过程中温度过低或者过高（低于 10°C，大于 30°C）。本试剂盒提供筛查神经性贝毒的筛查结果。阳性样本可采取其他的分析方法（GC, HPLC，其他方法）证明。

### A 试剂盒包括

1. 包被绵羊抗-神经性贝毒的酶标板
2. 标准品 PbTx-3 (8): 0, 0.010, 0.025, 0.05, 0.1, 0.25, 0.5, 2.0 ng/ml
3. 辣根过氧化物酶 (HRP)-神经性贝毒结合物, 6ml
4. 浓缩的样本稀释液 (1X) 2 X 30ml, 用于稀释样本
5. 浓缩的洗液 (5X), 100ml
6. 显色液 (TMB), 12ml
7. 终止液, 2 X 6ml

## 8. 海水前处理溶液 25ml



### B 实验准备

移液器，移液枪头。推荐使用多孔移液器或者可调移液器。相同的实验要使用同一个试剂盒内的试剂。

1. 使用前取出酶标板和试剂放置于室温下使其恢复到室温。
2. 取出所需的微孔。剩余的微孔放回袋中，密封，放置 4-8 度保存。
3. 标准品、酶结合物、底物、终止液无需进一步的稀释。
4. 按照 1: 5 稀释洗液。若使用 100ml 全瓶洗液，可加入 400ml 的去离子水或者蒸馏水稀释。
5. 终止液含有稀硫酸，小心放置。

### C 检测步骤

1. 按照既定计划，在放置有酶标条的孔中加入标准品溶液或者海水或者甲壳类样本提取液 50  $\mu$ l。推荐做双份或者三分重复。
2. 用多道移液器或者可调移液器连续加入 50  $\mu$ l 的酶结合物于各微孔孔中。封板，放置在振荡器上震荡 30 秒。防止溅出。室温孵育 60 分钟。
3. 孵育完毕，揭开板子，强烈摇起板孔中的沉淀。1X 洗液洗板 3 次。每孔每次最少用 250  $\mu$ l 的洗液洗涤。残留的液体需要放置在干净的纸上拍干。
4. 每孔加入 100  $\mu$ l 的底物溶液。室温 30 分钟孵育。避免直接光照。
5. 按照加入底物溶液的顺序，每孔依次加入 100  $\mu$ l 的终止液。
6. 加入终止液后 15 分钟内 450nm 读取吸光值。

### 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，以每个标准的神经性贝毒的浓度做X轴构建标准曲线。通过利用标准曲线，把对照和样品的%B/B0代入标准可以计算出样品中神经性贝毒的浓度。样品中神经性贝毒的含量小于0.01 ppb认为阴性。当样品中神经性贝毒的含量大于2.0 ppb要稀释后再测定。

### E 试剂盒不包括的设备

1. 带有可拆的吸液头的吸液管（10-200，200-1000 $\mu$ l）
2. 多道移液器（10-250 $\mu$ l），可调移液器（10-250 $\mu$ l）
3. 洗板机（可选）
4. 酶标仪（450nm）
5. 振荡器（可选）

### F 工作表

酶标板为12条8孔，可分别的应用于检测。标准品必须应用于每次检测。不要使用以前试验中标准品的值。

Std 0-Std 7: Standards（标准品）

0; 0.010; 0.025; 0.05; 0.1; 0.25 ; 0.5; 2.0 (ng/mL) or ppb

Sam1, Sam2, etc.: Samples（样品）

	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11
A	Std0	Std4	Sam1								
B	Std0	Std4	Sam1								
C	Std1	Std5	Sam2								
D	Std1	Std5	Sam2								
E	Std2	Std6	etc								
F	Std2	Std6	etc								
G	Std3	Std7									
H	Std3	Std7									

## G. 样本的制备

### I. 蚌类

1. 从壳内取出组织，用去离子水彻底清洗，干燥，均质
2. 取1.0克的均质完成的组织放入40ml的玻璃瓶
3. 加入9.0ml的甲醇/去离子水溶液（体积比9：1）
4. 盖住瓶子，摇动2分钟
5. 3000转离心10分钟，收取上清液。
6. 取出20u1的上清液，用已经稀释的稀释缓冲液（1：50）稀释稀释至1.0ml
7. 将此溶液作为样本稀释（见实验过程1）

含有神经性贝毒的样本的浓度需要乘以系数450，在曲线浓度范围外的高污染的样本需要进一步稀释，重新进行分析。

### II. 海水

1. 收集2ml的海水放入玻璃容器
2. 防止海水中的神经性贝毒在玻璃容器中损失，加入**浓缩**的样本稀释液0.5ml，手工混匀。
3. 将其作为分析样本（见实验过程1）

样本中的神经性贝毒浓度要乘以浓度系数1.25。在曲线浓度范围外的高污染的样本需要进一步稀释（按照1：5进行稀释，去离子水），重新进行分析。其他的样本稀释液可从Abraxis购买或者按照下面的方法制备：50%甲醇/50%的10XPBS/0.25%的吐温20

制备10XPBS溶液：11.50克的磷酸氢二钠、80克氯化钠、氯化钾2克、2克磷酸二氢钾。用去离子水稀释到1升。PH=7.0

### 神经性贝毒的判定的重要性

甲壳类动物的神经中毒是由于多醚毒素引起的，被称之为神经性贝毒。神经性贝毒由腰鞭毛虫*Karenia brevis*引起，由有害的海藻引起，我们称之为红潮。神经性贝毒对鱼类、海中的哺乳动物、鸟类、人类有害，但是对甲壳类动物无害。被神经性贝毒污染的甲壳类动物与世界上不同的有害海藻有关。

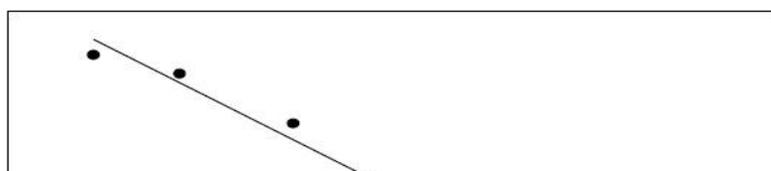
鱼、海牛、海豚以及海鸟都有死亡记录登记在HABs。人被神经性贝毒污染，则会导致腹泻、恶心、呕吐、寒战、发热、眩晕、血压过低、心律不齐、麻痹、兴奋、支气管痉挛、瘫痪、昏迷的临床症状。

本试剂盒可以检测40个可做双份重复的样本。仅需几毫升的溶液。本实验可在2小时之内完成。

### 数据

#### 敏感性

最低检测由此计算： $X_n \pm 3SD$  (n=20)，海水样本为0.05ng/ml，甲壳类为22.5ng/ml（若稀释系数为450）。导致50%残留（50B/B0）与剩余残渣的浓度有关，浓度近似为0.16ng/ml。测定值与标准范围内的所有的正确结果的中间值接近。



重复性：标准品的变化系数（CVs）小于10%，样本小于15%

选择性：检测神经性贝毒以及其他不同级别的神经性贝毒

交叉反应：

PbTx-3	100%
Deoxy PbTx-2	133%
PbTx-5	127%
PbTx-2	102%
PbTx-9	83%
PbTx-6	13%
PbTx-1	5%

与下列的PSP(麻痹性贝毒)无交叉反应：saxitoxin(贝类毒素), neosaxitoxin, dc-STX, gonyautoxins-1/4, gonyautoxins-2/3, B-2; B-1; C-1/2 and domoic acid (多摩酸)。

样本：海水以及甲壳类(按照推荐稀释)作为基质影响被检测。无基质影响被检测。