



# 麻痹性贝类毒素(PSP)检测试剂盒说明书

PN 52255B

(中文说明书仅供参考请以英文为准)

## 1. 概述

本检测采用酶联免疫法定量检测麻痹性贝类毒素的存在。神经性贝毒是一种毒素，石房蛤毒素是麻痹性贝类毒素的一种。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石房蛤毒素。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，用特异性抗体识别石房蛤毒素。样本中的石房蛤毒素可与石房蛤毒素-酶结合物竞争，同包被在微孔板上的兔抗-石房蛤毒素抗体结合。石房蛤毒素抗体与包被在微孔底部的二抗结合。洗板后加入底物溶液，显蓝色。蓝色的深度与石房蛤毒素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. 试剂盒组成

1. 真空包装微孔板（12×8 条），包被一种羊抗兔二抗
2. 标准液（6）：0, 0.02, 0.05, 0.1, 0.2 和 0.4 ng/mL (ppb)
3. 1 瓶 6mL 抗体（兔抗石房蛤毒素抗体）
4. 1 瓶 6mL 石房蛤毒素-HRP 酶标记物
5. 2 瓶 25ml 样品稀释缓冲液(10 倍浓缩)(即用即配，例如：10ml 浓缩缓冲液+90ml 蒸馏水)
6. 1 瓶 100ml 洗板缓冲液(5 倍浓缩)(即用即配，例如：10ml 浓缩缓冲液+40ml 蒸馏水)



7. 1 瓶 12 mL 底物（显色液 TMB）
8. 1 瓶 12mL 终止液

## 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、抗体、底物、终止液无需进一步的稀释可直接使用。
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。（可以根据用量的多少来配制。
5. 用蒸馏水按 1: 10 的比例稀释样本稀释液。
6. 终止液含有稀硫酸，小心放置。
7. 淡水样品有即时收集以免石房蛤毒素的损失。

## C. 操作步骤

- 1、在对应的微孔中加入 50  $\mu$ 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  $\mu$ L 石房蛤毒素酶标记物溶液。
- 3、每个测试孔都加入 50  $\mu$ L 石房蛤毒素抗体溶液，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 30 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  $\mu$ L 1 X 的洗液。拍板，去掉残留的洗液。
- 6、每个测试孔加入 100  $\mu$ L 的显色液（底物）。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。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  $\mu$ 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/B<sub>0</sub>（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/B<sub>0</sub> 做 Y 轴，以每个标准的石房蛤毒素的浓度做 X 轴构建标准曲线。通过利用标准曲线，把样品的 %B/B<sub>0</sub> 代入标准可以计算出样品中冈田酸的浓度。样品中石房蛤毒素的含量小于 0.02 ppb 认为阴性。当样品中石房蛤毒素的含量大于 0.4 ppb 要稀释后再测定。

## E. 试剂盒未提供的材料

1. 可吸取 10-200ul 和 100-1000ul 的移液器及吸头.
2. 可吸取 10-300ul 八道移液器及吸头。
3. 450nm 的酶标仪。

## 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-Sd5: 标准 0; 0.02; 0.05; 0.10; 0.20; 0.40ppb

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	Sam1										
F	Std2	Sam1										
G	Std3	Sam2										
H	Std3	Sam2										

## G. 样品前处理

**水样前处理** 稀释倍数为(1. 1)

取900ul水样加入100ul 10倍浓缩的样品稀释液，待测

**肌肉前处理** 稀释倍数为(1:2000)

- 1、除去贝壳，用双蒸水洗净贝肉后均质器均质。
- 2、称取 10g 均质后的样品加入 10ml 80% 0.1M HCl，煮沸 5min，边煮沸边搅拌。
- 3、冷却后 3500g 离心 10min。
- 4、用 5N HCl 调节 pH，使 pH 小于 4。
- 5、取 10ul，用样品稀释液稀释到 10ml，震荡（稀释倍数 1：1000）。
- 6、待测

注意：可以根据需要改变样品的稀释倍数

### 肌肉前处理（可选用）

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：3000g 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，3000g 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 10ul 滤液，用样品稀释缓冲液稀释到 1ml(100 倍稀释)
7. 取 100ul 用试剂盒进行分析，此时的稀释倍数是 1000。

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。

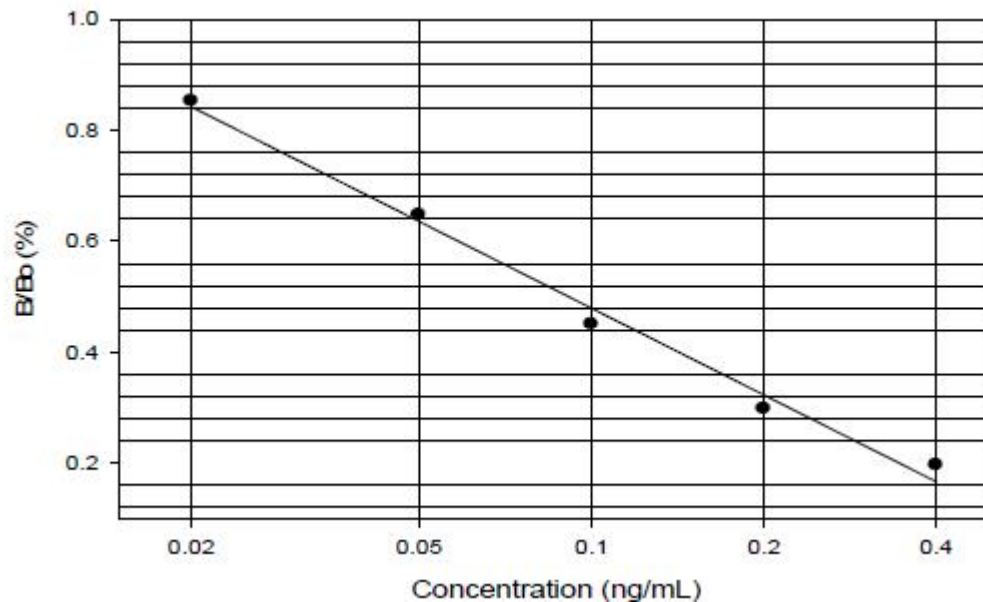
### 石房蛤毒素测定的重要性

石房蛤毒素是麻痹性贝类毒素的一种由几种甲藻和淡水藻产生。石房蛤毒素污染的贝类和世界范围有害藻类大量繁殖有关。PSP 可以引起剂量依赖型的口周麻木、刺痛感和肌肉麻痹。欧盟和 FDA 的限量是 40-80ug/100g。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，检测时间大约 1 小时。

### 试剂盒特性

敏感性：0.015ppb

标准曲线：



### 特异性

麻痹性贝类毒素检测试剂盒能检测 Saxitoxin 及其它 PSP，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
<b>Saxitoxin (STX)</b>	<b>100%</b>	<b>Decarbamoyl GTX 2 &amp; 3</b>	<b>1.4%</b>
<b>Decarbamoyl STX</b>	<b>29%</b>	<b>Neosaxitoxin</b>	<b>1.3%</b>
<b>GTX 2 &amp; 3 23%</b>	<b>23%</b>	<b>Decarbamoyl Neo STX</b>	<b>0.6%</b>
<b>GTX-5B</b>	<b>23%</b>	<b>GTX 1 &amp; 4</b>	<b>&lt;0.2%</b>
<b>Sulfo GTX 1 &amp; 2</b>	<b>2.0%</b>		

重复性：标准的变异系数小于 10%，样品的变异系数小于 15%

样 品：水样和贝类产品