

# 失忆性贝类毒素 (ASP) 检测试剂盒

PN ON0021

(中文说明书仅供参考请以英文为准)

## 1. 概要

这个软骨藻酸 (ASP) ELISA 检测方法可以很敏感的定量检测软骨藻酸的含量。软骨藻酸是和健忘性贝类毒素相关的一类海藻产生的水溶性毒素。试剂盒用于定量或定性检测检测水样和贝类样品中软骨藻酸的含量。贝类样品需要进行样品前处理。如果需要可以用传统的方法例如 HPLC,GC/MS 来证实。

## 2. 安全说明

试剂盒中的标准溶液里含有少量的软骨藻酸。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软骨藻酸。当样品中含有软骨藻酸时，样品中的软骨藻酸与软骨藻酸酶结合物竞争结合溶液中的软骨藻酸抗体。软骨藻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软骨藻酸的含量成反比。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软骨藻酸的含量。

## 5. 软骨藻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. 软骨藻酸测定的重要性

软骨藻酸及其衍生物是一类海藻产生的水溶性毒素，主要是大亚湾拟菱形藻等微藻类生物。大亚湾拟菱形藻水华会导致贝类等滤食性生物体内软骨藻酸的富集。

ASP 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 20ppm。欧洲是 20mgDA/kg。

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。

#### A. 试剂盒组成:

- 1、包被二抗的微孔板（羊抗鼠）
- 2、标准（5种）0、0.5、1.0、2.0、5.0、10.0 ng/ml
- 3、1瓶对照（1ml）浓度 3.5 ng/ml
- 4、软骨藻酸抗体溶液（鼠抗软骨藻酸）6ml
- 5、软骨藻酸酶标记物 6ml
- 6、样品稀释液（25ml）用于稀释样品
- 7、5x 浓缩洗液 100ml
- 8、显色液（底物）TMB,16ml
- 9、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50  $\mu$ L的标准、对照和样品（推荐做2-3个重复）
- 2、每个测试孔都加入50  $\mu$ L软骨藻酸酶标记物溶液。
- 3、每个测试孔都加入50  $\mu$ L软骨藻酸抗体溶液，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  $\mu$ 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）。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50 $\mu$ 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/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，以每个标准的软骨藻酸的浓度做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软骨藻酸的浓度。样品中软骨藻酸的含量小于0.5 ppb认为阴性。当样品

中软骨藻酸的含量大于10.0 ppb要稀释后再测定。

### E 试剂盒未提供的材料

- 1、10-200u1和200-1000u1的移液器及吸头。
- 2、10-250u1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-Sd5: 标准 0; 0.5; 1.0; 2.0; 5.0; 10.0 ppb

Control: 对照

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	Control										
F	Std2	Control										
G	Std3	Sam1										
H	Std3	Sam1										

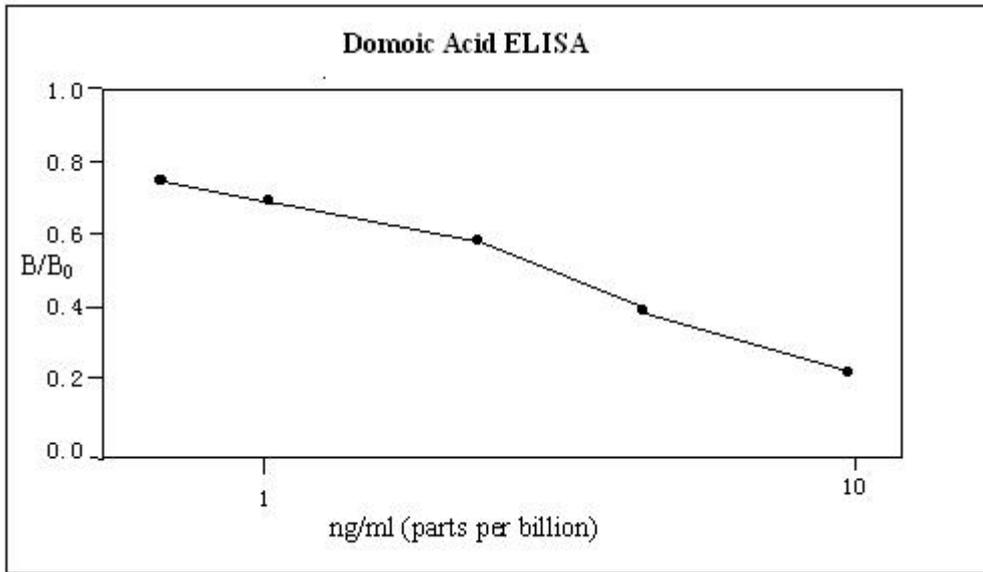
### G. 样品处理(肌肉)

- 1、从贝壳中剥离出肌肉，用蒸馏水洗干净彻底干燥然后均质。
- 2、取 0.5 克均质化的样品然后加入 2ml 甲醇/蒸馏水（50/50）,震荡 1 分钟。
- 3、离心：4000g，15 分钟，室温。收集上清。
- 4、移取 20ul 收集的上清液用样品稀释液稀释到 1ml（1：50）
- 5、分析稀释后的提取物作为样品待测。

稀释倍数为 200，在计算结果时要乘以稀释倍数 200.

### 试剂盒特性

#### 标准曲线



**敏感性:** 2.2ng/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:** 可以不同程度地检测软骨藻酸和其他 ASP 毒素

**交叉反应:** Domoic Acid (DA) 100%

和 saxitoxin、okadaic acid、PbTx-2 没有交叉反应

**样 品:** 水样和贝类产品