

呕吐毒素免疫亲和柱说明书

1、用途:

免疫亲和柱可选择性吸附样品液中的脱氧雪腐镰刀菌烯醇(呕吐毒素, DON), 从而对样品起到非常针对性的净化作用, 过柱净化后的样品液氮吹复溶后可直接用于 HPLC/LC-MS/MS 分析。

亲和柱与 HPLC 或 LC-MS/MS 配合使用可达到快速测定的目的, 以改善信噪比, 可提高检测方法的准确度。

2、概述:

脱氧雪腐镰刀菌烯醇 (deoxynivalenol) 又称呕吐毒素 (Vomitoxin) 属于霉菌的单端孢菌素族, 由某些镰刀霉真菌属产生。呕吐毒素多分布于小麦、大麦、玉米等谷物籽实中, 含量通常是 mg/kg 级的, 因为他们具有高的细胞毒性及免疫抑制性, 所以对人类及动物构成了健康威胁。

3、原理:

测定的基础是抗原、抗体反应, 抗体连接在柱体内, 样品经过提取、过滤后, 缓慢的通过脱氧雪腐镰刀菌烯醇免疫亲和柱, 在免疫亲和柱内毒素与抗体结合, 之后洗涤免疫亲和柱除去没有被结合的其他无关物质。用甲醇洗脱脱氧雪腐镰刀菌烯醇, 经氮气吹干复溶后注入到分析仪器中用于检测。

4、包装组成:

每一个盒中包括各种规格脱氧雪腐镰刀菌烯醇免疫亲和柱及 1 份说明书。

5、需要的材料但盒中不提供:

5.1 设备及耗材

- HPLC/LC-MS/MS
- 气控操作架 (配空气泵)
- 天平
- 高速均质器 (最高转速 $\geq 10,000$ r/min) 或摇床
- 粉碎机
- 氮吹仪 (配氮气瓶)
- 分样筛 (1mm 孔径)
- pH 计或 pH 试纸
- 量筒: 100mL/10mL
- 漏斗: 50mL
- 注射器: 10 mL/20mL
- 移液器或移液管: 1mL
- 均质器 (或 250mL 具塞锥形瓶)
- 样品瓶
- 快速定性滤纸
- 微纤维滤纸 (Whatman 934-AH)

----微孔滤器 (有机系)

5.2 试剂

- 甲醇 (CH_3OH): 色谱级
- 氯化钾 (KCl): 分析纯
- 氯化钠 (NaCl): 分析纯
- 磷酸二氢钾 (KH_2PO_4): 分析纯
- 十二水合磷酸氢二钠 ($\text{Na}_2\text{HPO}_4 \cdot 12\text{H}_2\text{O}$): 分析纯
- 吐温-20 ($\text{C}_{58}\text{H}_{114}\text{O}_{26}$): 分析纯
- 聚乙二醇 (分子量 8000, $\text{HO}(\text{CH}_2\text{CH}_2\text{O})_n\text{H}$): 分析纯, 聚乙二醇的作用是提高过滤速度, 如采用离心方式获得上清液可以不加该试剂。
- 氢氧化钠 (NaOH): 分析纯
- 盐酸 (HCl): 分析纯
- 水 (H_2O): 蒸馏水或去离子水

6、注意事项:

- 使用前, 免疫亲和柱需回至室温 ($22 \sim 25^\circ\text{C}$)。
- 亲和柱 $2 \sim 8^\circ\text{C}$ 储存, 不得冻存。
- 不要使用过了有效日期的免疫亲和柱。
- 取样量: 根据需要可以适当增加或减少取样量, 注意提取液量要相应改变。
- pH: 亲和柱的上样溶液 pH 需在 $6 \sim 8$ 之间, 若偏离此范围需要用盐酸或氢氧化钠调节 pH。
- 柱容量: 1200ng, 当样本中待检毒素的含量除以稀释倍数高于柱容量时, 需要适当降低上样液的体积, 重新检测。
- 上机检测时的溶剂与流动相一致可消除溶剂效应的影响。
- 呕吐毒素可致癌, 应戴手套口罩等防护工具操作。
- 使用过的容器及标准品溶液最好用次氯酸钠溶液 (5%V/V) 浸泡过夜。

7、所需溶液的配制:

7.1 PBS 缓冲液:

----称取 8g NaCl、0.2g KCl、0.2g KH_2PO_4 和 1.16g $\text{Na}_2\text{HPO}_4 \cdot 12\text{H}_2\text{O}$, 加入 800mL 超纯水溶解, 定容至 1L。

7.2 乙腈-水 (8+2):

----取 800mL 乙腈, 加入 200mL 去离子水。

7.3 0.1%吐温-水:

----取 1mL 的 Tween-20, 加水定容至 1L。

8、样品处理:

8.1 粮食及饲料

8.1.1 玉米、小麦、面粉、配合饲料、浓缩料、精补料等吸水性较小的样本

----25g \pm 0.01g 样品 (固体样品需粉碎, 并过 1mm 分样筛),

加入 5g 聚乙二醇, 100mL 水;

----高速均质 ($\geq 10,000$ r/min) 1min, 或用摇床 200r/min ~ 300r/min 剧烈振荡 20min;

----用快速定性滤纸过滤, 收集滤液;

----滤液再用微纤维滤纸过滤, 并收集滤液作为上样液;

----取 2mL 上样液过免疫亲和柱净化。稀释倍数: 2

8.1.2 麸皮、豆皮、玉米胚芽粕、米糠等吸水性较强的样本

----10g \pm 0.01g 样品 (固体样品需粉碎, 并过 1mm 分样筛), 加入 2g 聚乙二醇, 100mL 水;

----高速均质 ($\geq 10,000$ r/min) 1min, 或用摇床 200r/min ~ 300r/min 剧烈振荡 20min;

----用快速定性滤纸过滤, 收集滤液;

----滤液再用微纤维滤纸过滤, 并收集滤液作为上样液;

----取 5mL 上样液过免疫亲和柱净化。

稀释倍数: 2

8.2 酒类

----取酒样 20g(准确到 0.1g), 加入 1g 聚乙二醇, 用水定容至 25.0mL, 混匀, 置于超声波/涡旋振荡器或摇床中超声或振荡 20min。用玻璃纤维滤纸过滤至滤液澄清(或 6000r/min 下离心 10min), 收集滤液于干净的容器中。

----取 2mL 上样液过免疫亲和柱净化。

稀释倍数: 0.625

8.3 酱油、醋、酱及酱制品

----称取样品 25g(准确到 0.1g), 加入 5g 聚乙二醇, 用水定容至 100mL, 混匀, 置于超声波/涡旋振荡器或摇床中超声或振荡 20min。以玻璃纤维滤纸过滤至滤液澄清 (或 6000r/min 下离心 10min), 收集滤液于干净的容器中。

----取 2mL 上样液过免疫亲和柱净化。

稀释倍数: 2

8.4

婴幼儿米粉

----25g \pm 0.01g 样品 (固体样品需粉碎, 并过 1mm 分样筛), 加入 100mL 乙腈-水 (8+2);

----高速均质 ($\geq 10,000$ r/min) 1min, 或用摇床 200r/min ~ 300r/min

剧烈振荡 20min;

----用快速定性滤纸过滤, 收集滤液;

----取 10mL 混匀后的液体, 加入 70mL PBS 缓冲液, 混匀;

----用微纤维滤纸过滤, 并收集滤液作为上样液;

----取 16mL 上样液 (相当于 0.5g 样品) 过免疫亲和柱净化。

稀释倍数: 2

9、操作程序:

----取出免疫亲和柱, 将注射器筒的下端直接穿透亲和柱上方的塞子, 完成注射器筒与亲和柱的连接, 将其放置在气控操作架上进行固定;

----取适量步骤 8 中处理后的溶液, 注入到注射器筒中;

----去掉亲和柱下方堵头, 调节开关, 使液体以 1~2 滴/秒的速度流出;

----待液体排干后, 方法 8.1 中的样品用水洗涤 2 次, 每次 10mL, 其余样品首先用 0.1%吐温-水溶液洗涤 10mL, 再用水洗涤 10mL, 流速 2~3 滴/秒;

----待液体排干后, 上样 1mL 甲醇, 流速 1 滴/秒, 收集洗脱液并在 50~60°C 加热条件下 N₂ 气吹干, 然后用 1mL 流动相复溶; ----复溶液用 0.22 μ m 微孔滤器过滤后转移至样品瓶中用于 HPLC 或 LC-MS 等仪器分析。

* 每次上样前都要将上次液体完全排干。

* 也适用于 GB 5009.111-2016 和 GB/T30956-2014。

10、结果判读:

脱氧雪腐镰刀菌烯醇的含量=检测浓度 \times 稀释倍数

11、贮藏条件及有效期

贮藏条件: 2~8°C。

有效期: 该产品有效期为 12 个月。