

Read kube 葡萄球菌肠毒素 (SET2)

仅供实验室用

Read kube 葡萄球菌肠毒素 (SET2) 试剂盒是应用 Vitek 免疫诊断分析系统 (Read kube) 对食品中的葡萄球菌肠毒素进行自动定量酶联荧光免疫分析 (ELFA)。

概述

葡萄球菌肠毒素 (SET) 是食物中毒最常见的原因之一。已知它有 7 个血清型，命名为 SEA, SEB, SEC1-3, SED 和 SEE. 这些蛋白质主要由金黄色葡萄球菌产生，其它如中间型葡萄球菌和猪葡萄球菌也可能产生肠毒素。一般而言，凝固酶阴性者如表皮葡萄球菌不产生肠毒素，但至少已经报到了一次由它引起的疾病爆发。因此，如果凝固酶阴性葡萄球菌大量存在于食物中也不应忽视，应测定肠毒素的产生。

虽然热处理可破坏葡萄球菌，但毒素对热稳定，在高温时仍保持活性。常见污染食品包括肉类、家禽、罐装蘑菇、奶制品、蛋类和蛋黄酱。肠毒素以 SEA 最为常见 (约占 75%)，其次是 SED。

只需简单的提取后，Read kube SET2 试剂盒可直接用于筛选食物中任何一种肠毒素的存在，实验是全自动化，80 分钟可获结果。

实验原理

Read kube SET2 试剂盒是用自动化 Read kube 设备进行酶联荧光免疫分析 (ELFA) 以测定葡萄球菌肠毒素 (见 Read kube 操作手册)。

固相容器 (SPR) 是类似于加样头的一次性装置，用作固相及加样器之用。SPR 内壁用鼠抗葡萄球菌肠毒素单克隆抗体包被。实验所需试剂均封闭在试剂条里。

Read kube 系统自动完成全部实验程序。将食物提取物加于试剂条上，样品将在 SPR 内定时循环，样品中的葡萄球菌肠毒素与包被在 SPR 内侧的抗葡萄球菌肠毒素多克隆抗体结合，未结合的样本则被洗去。抗体-碱性磷酸酶复合物通过 SPR 循环并与 SPR 壁上的任何肠毒素抗原结合，最后洗去未结合复合物。

荧光底物 (4-甲基-香豆素-磷酸酯) 在 SPR 内外反复循环，SPR 上存留的酶催化底物分解为荧光产物 (4-甲基-伞形酮)。Read kube 的光扫描仪在 450nm 处自动测定荧光强度。

实验结束时，计算机自动分析结果并打印报告，得出检测值并与阈值比较，得出最终解释 (阳性或阴性)。

试剂盒的组成 (30 人份)

30 个 SET2 试剂条	STR	即可使用。
30 个 SET2 SPRs	SPR	SET2 SPR 的内面制造时已用鼠抗葡萄球菌肠毒素单克隆抗体包被。
1 瓶标准液 (1×6ml)	S1	纯化的葡萄球菌肠毒素 A (<1ng/ml)，含 1g/l 叠氮钠和蛋白稳定剂。 注意：小心操作！
一瓶阳性对照 (1×6ml)	C1	纯化的葡萄球菌肠毒素 A (<1ng/ml)，含 1g/l 叠氮钠和蛋白稳定剂，瓶签标出对照范围。 注意：小心操作！
一瓶阴性对照 (1×6ml)	C2	TRIS-NaCl (150mmol/l) - Tween pH 7.6+1g/l 叠氮钠。
一瓶浓缩的提取缓冲液 (1×55ml)	R1	2.5mol/L TRIS* - 10g/l Tween -10g/L MIT pH8.0。
MLE 卡		包含校正测试所需的工厂校正数据。

*刺激性试剂

如需了解更多信息，请索取安全手册。

SPR: 在生产时将 SRP 内壁以抗葡萄球菌肠毒素单克隆抗体包被。每一 SPR 上均标有“SET2”。从包装袋中取出 SPR 后要及时封闭包装袋。

试剂条: 包含 10 个以箔封的孔，并覆以标签，标签上有条形码，显示测试种类，试剂盒批号、有效期等。第一孔加入样本，最后一孔是荧光测定用比色杯。中间各孔含有实验用各种试剂。

葡萄球菌肠毒素试剂条说明

孔	试剂
1	标本孔：此孔加 0.5ml 食品提取液。
2	前洗涤液 (0.4ml)：TRIS-NaCl (150mmol/l)-Tween pH7.6- 小牛血清- 1g/l 叠氮钠。
3-4-5-7-8-9	洗涤液 (0.6ml)：TRIS-NaCl (150mmol/l)-Tween pH7.6+1g/l 叠氮钠。
6	酶结合物 (0.4ml)：含有 1g/l 叠氮钠的碱性磷酸酶标记的抗葡萄球菌肠毒素多克隆和单克隆抗体。
10	含底物 (0.3ml) 的小比色杯：磷酸 4-甲基伞形物 (0.6mmol/l)+二乙醇氨* (DEA) (0.62mol/L 或 6.6%, pH9.2)+1g/l 叠氮钠。

*刺激性试剂

如需了解更多信息，请索取安全手册。

试剂盒未提供但应具备的设备

- 带一次性加样头的加样量为 500 μ l 的加样器；
- 搅拌器或消化袋；
- 离心管 (50ml)；
- 注射器 (20ml)；
- pH 试纸；
- 三氯乙酸；
- TRIS；
- 氢氧化钠。

注意事项

- 仅供微生物实验用。
- 仅供专业使用。
- 请将 Read kube 系统放置在微生物测试专用房间。
- 试剂盒含有动物源性成分，所获得的动物来源与卫生状况的有关知识并不能保证其不含有可传播的病原因子。建议将其作为潜在传染物对待并按照安全程序来处理（勿食入或吸入）。
- 如包装袋破裂，请不要使用 SPRs。
- 如试剂条有可见的破损（锡箔或塑料破损）则不要使用。
- 请勿使用超出有效期的试剂。
- 不同批号试剂请勿混合。
- 阳性对照与标准液含有纯化的葡萄球菌肠毒素。操作时要十分小心并穿戴上保护性装置（外套、手套和眼镜）。如不小心误食请立即就医。

- 试剂中含叠氮钠，该物质可与铅或铜管道反应形成爆炸性金属叠氮物。如果含叠氮钠的液体在这样的管道系统中处理，要用大量的水冲洗以避免形成金属叠氮物。
- 第十孔中含有刺激性试剂（6.6%二乙醇氨），参照以上试剂盒成份表的“R”和“S”标记。
- 离心提取缓冲液含有刺激性试剂（TRIS），参照以上试剂盒成份表的“R”和“S”标记。
- 试剂盒的所有试剂均应作为潜在生物危险材料。请使用正确的方法来处理使用过和被污染的材料。
- 常规清洁和清洗 Read kube 仪器，参阅 Read kube 操作手册有关步骤。

保存

- Read kube 试剂盒存于 2-8° C。
- 切勿冷冻试剂。
- 未用的试剂放回 2-8° C。
- 打开试剂盒后，检查包装袋是否破裂，如破裂则不要使用 SPRs。
- 为使试剂条保持稳定，从包装袋内取出 SPR 后应使用封条再封好包装袋并放回 2-8° C。
- 如果按照以上建议保存，所有试剂在有效期内稳定性不变。

标本制备

提取缓冲液的配置

将试剂盒提供的浓缩提取液以无菌蒸馏水稀释至 1 升，混匀，2-8° C 保存可使用 3 个月。
也可根据使用的频率配置所需体积的缓冲液（稀释比=1/18）。

食品提取液的 pH 值调整

建议使用 3 色的试纸条，精度不低于 0.5pH 单位。

1. 一般提取方法

- 向 25g 食品中加入 25ml 配好的提取缓冲液；
- 混匀以得到均匀悬液；
- 18-25° C 静置 15 分钟；
- 将悬液于 18-25° C 3000-5000g 离心 15 分钟，并将上清液通过浸湿的棉花压出；
- 使用 1N 氢氧化钠调整滤液 pH 至 7.5-8.0 之间；
- 回收 500 μ l 滤液，放入 Read kube SET2 试剂条的样品孔中。

2. 液体食品

- 按照制造商的说明来稀释浓缩的液体食品；
- 使用 1N 氢氧化钠调整液体 pH 至 7.5-8.0 之间；
- 如有沉淀，按照通用的提取方法将悬液离心与过滤；
- 回收 500 μ l 滤液，放入 Read kube SET2 试剂条的样品孔中。

3. 脱水食品

- 加入等量蒸馏水（或根据制造商的说明）使食品水化；
- 室温放置 1 小时；
- 称取水化食品 25 克加入提取缓冲液 25ml；
- 如上所述方法进行提取。

4. 罐装食品

- 将罐内所有食品或取代表性的部分混匀以得到均匀的悬液；
- 向 25g 食品中加入 25ml 配好的提取缓冲液；
- 如上所述方法进行提取。

5. 生肉、海产品与熟肉

- 于 25g 食品中加入 25ml 蒸馏水；

- 混匀以得到均匀悬液，如悬液过稠，再加 25ml 蒸馏水混匀；
- 回收全部的提取液；
- 使用 5N HCl 调整 pH 值至 4.0；
- 18-25° C 静置 15-30 分钟；
- 将悬液于 18-25° C 3000-5000g 离心 15 分钟，并将上清液通过浸湿的棉花压出；
- 使用 1N 氢氧化钠调整滤液 pH 至 7.5-8.0 之间；
- 如有沉淀，按前述方法取部分进行离心；
- 回收 500 μl 滤液，放入 Read kube SET2 试剂条的样品孔中。

6. 奶制品

不富集的方法

- 于 25g 食品中加入 40ml 预温至 38±2° C 的蒸馏水；
- 混匀以得到均匀悬液；
- 18-25° C 静置 30 分钟；
- 使用 5N HCl 调整 pH 值至 3.5-4.0；
- 将悬液于 18-25° C 3000-5000g 离心 15 分钟；
- 使用 1N 氢氧化钠调整回收滤液的 pH 至 7.5-8.0 之间；
- 将悬液于 18-25° C 3000-5000g 离心 15 分钟，如有必要则过滤；
- 回收 500 μl 滤液，放入 Read kube SET2 试剂条的样品孔中。

液体食品（如牛奶）

- 使用 5N HCl 调整 25ml 或 25g 食品的 pH 值至 3.5-4.0；再按照前述程序进行处理。

使用聚乙二醇进行透析

此程序由法国奶制品分析行政管理部门所推荐。此程序按照 DGAL/SDHA/N2001-808 所规定的方法来进行。

三氯乙酸（TCA）富集法

推荐使用，此方法可提高灵敏度，并可抑制某些生奶酪中可能出现的干扰（如羊乳干酪等）。

- 按照以上奶制品的处理程序进行，至第一步离心结束；
- 回收上清并量取其体积 V；
- 于上清液（V）中加入一定体积（Y）的 TCA 溶液（90%水溶液），得到终浓度为 5%的溶液；

$$Y = V \times 5 / 100$$
- 混匀，在 18-25° C 静置 30 分钟使蛋白沉淀；
- 在 18-25° C 以 3000-5000g 离心 30 分钟；
- 弃掉上清；
- 在 0.3M 的 TRIS (pH=8) 溶液中溶解蛋白小球，所用 TRIS 溶液的体积为上述上清体积 V 的 1/10；
- 使用 4N 氢氧化钠调整溶液的 pH 至 7.5-8.0 之间；在此 pH 下，乳液变为清澈。如有悬浮颗粒，在 18-25° C 以 3000-5000g 离心 15 分钟；
- 回收 500 μl 滤液，放入 Read kube SET2 试剂条的样品孔中。

提取液的保存

必须于提取后立即进行 Read kube SET2 检测。除奶制品之外的其它食品的提取液，可在 -25±6° C 储存 7 天。但个别情况下信号值会下降。

操作指南

输入 MLE 卡信息

每一个新试剂盒在使用之前，首先要使用试剂盒中的 MLE 卡向仪器输入试剂规格（或出厂的校正曲线数据），否则方法将无法运行。每一盒试剂只需输入一次。可以使用 MLE 卡自动输入或手动输入。

校正

每一个新试剂盒在输入 MLE 卡信息之后，需使用试剂盒内的校正液进行校正，以后每 14 天进行一次校正。此项操作可以提供仪器特定的校正曲线，对于在有效期内可能出现的小的分析信号偏移可以进行补偿。

校正液 S1 在同一次测试中必须做**双份**（详见 Read kube 操作手册）。校正值必须在设定的 RFV(相对荧光值)值之内，否则，需重新校正。

实验程序

1. 冰箱中取出所需试剂并使其恢复到室温（至少 30 分钟）；
2. 每一个样品（质控或对照）使用一根 Read kube SET2 试剂条和一个 SPRs。取出所需的试剂后，包装袋需重新封好；
3. 在仪器中键入或选择“SET2”以建立实验代码。标准必须以“S1”标记并作双份。如需做阳性对照和阴性对照，应分别以“C1”和“C2”标记；
4. 测定前将标准、对照和样本充分混匀以保证测试的重复性。**为保证校正的准确性，准确吸取 500 μ l 标准液：**
5. 将 500 μ l 标准、对照和样本分别注入试剂条样本孔；
6. 将 SET2 试剂条和 SET2 SPRs 装在 Read kube 相应的位置。核对位置以确保 SPR 上 3 个字母编码的颜色标记与试剂条相符。
7. 根据 Read kube 操作手册开始分析步骤。所有分析过程均由仪器自动完成。70 分钟可完成实验。
8. 测试完成后，从仪器中取出试剂条和 SPRs；
9. 所有用过的 SPRs 和试条丢弃于适当的容器。

结果与解释

检测完成后，结果由计算机自动分析。每份样品有两个荧光读数，第一个数值表示 SPR 加入底物前，底物孔的本底值。第二个数值则表示 SPR 内侧的酶复合物接触底物后的荧光强度值，该数值扣除本底后则为相对荧光值（RFV）。计算过程列于结果报告中。

每一样本的 RFV 值由 Read kube 按以下公式计算：

$$\text{检测值} = \text{样品 RFV} / \text{标准 RFV}$$

阈值和结果解释

检测阈值	解释
< 0.13	阴性
≥0.13	阳性

打印报告内容包括试验类型、样本号、日期和时间、试剂盒批号及有效期、每个样品的 RFV、检测值和相应结果的解释。

实验数值低于阈值下限表明样品不含有葡萄球菌肠毒素或毒素浓度低于检测限。若大于（或等于）阈值上限则表明样品含有葡萄球菌肠毒素。

本底数值超过预测的分界值（提示有底物污染）时，结果无效。对此可用原标本和相应的试剂（标准和质控）重新检测。

如果所检测样本的试剂条没有做标准，结果亦为无效。对此，可用相同批号的 SET2 试剂条做双份标准，结果可根据新存储的标准重新计算。详见 Read kube 操作手册。

质量控制

试剂盒附有一瓶阳性对照和一瓶阴性对照。

每批新的试剂盒首次使用时均应用阴性和阳性对照进行检测，以证明试剂性能未受影响。每次校正时也必须测定对照。阳性和阴性对照分别标以 C1 和 C2，仪器会自动识别。如果所测对照数值超过预期值，结果无效。

注：使用者如按照其它方法进行质控测试，结果自负。