

## 呕吐毒素（DON）ELISA 快速检测试剂盒说明书

产品编号：HEM0948F

### 一、概要

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（ppm）级的，由于其具有高的细胞毒素及免疫抑制性质，对人类及动物构成了健康威胁。

本试剂盒是应用 ELISA 最新技术研发而成的检测产品，能最大限度地减少操作误差和工作强度。

### 二、试验原理

本试剂盒采用间接竞争 ELISA 方法，在酶标板微孔条上预包被呕吐毒素抗原，样本中的呕吐毒素和微孔条上预包被的抗原竞争抗呕吐毒素抗体（抗试剂），同时呕吐毒素抗体与酶标二抗（酶标物）相结合，经 TMB 底物显色，样本吸光度值与其所含呕吐毒素量呈负相关，与标准曲线比较再乘以其对应的稀释倍数，即可得出样本中呕吐毒素的含量。

### 三、适用范围

可定性、定量检测粮食样本中呕吐毒素的含量。

### 四、交叉反应率

脱氧雪腐镰刀菌烯醇（呕吐毒素）	100%
3-乙酰基脱氧雪腐镰刀菌烯醇	<1%
雪腐镰刀菌烯醇	<1%

### 五、提供的材料与试剂

组份名称	48T 装量
酶标板	48T
标准品（高标）1 ppm	10ml
浓缩标准品稀释液（20×）	10ml
DON 抗试剂	3ml
DON 酶标物	3ml
底物液	6ml
终止液	3ml
浓缩洗涤液（10×）	20ml

### 六、使用单位需自备的设备

- 酶标仪 450nm/630nm
- 振荡器
- 恒温培养箱（室温能达到 25 摄氏度可不选）
- 定量滤纸
- 天平：感量 0.01g
- 具塞三角瓶：100ml
- 比色管：25ml

-----容量瓶：10ml

-----移液管：1ml（单标线）、5ml（刻度）、50ml（单标线）

-----带塞离心管：不小于 7ml

-----微量移液器：单道 10μl~100μl、100μl~1000μl

### 七、溶液的配制

#### 配液 1：工作浓度标准品稀释液

用去离子水将浓缩标准品稀释液（20×）按 1:19 体积比进行稀释，即 1 份浓缩标准品稀释液（20×）加入 19 份去离子水，振荡摇匀。

#### 配液 2：洗涤工作液

用去离子水将浓缩洗涤液（10×）按 1:9 体积比进行稀释，即 1 份浓缩洗涤液（10×）+9 份去离子水；用于酶标板的洗涤，洗涤工作液在 4℃ 环境可保存一个月。

#### 配液 3：工作浓度标准品的配制

准备 5 个 10ml 洁净容量瓶，在其中一容量瓶中先加入少量工作浓度的标准品稀释液，用 5ml 移液管准确移取 3ml 1ppm 高浓度标准品到容量瓶中，轻轻摇匀，再用工作浓度标准品稀释液定容到 10ml 后，盖上瓶塞摇匀，贴上标签即可。用同样的方法配制后面四个标准品，加入高浓度标准品量比较小的可用移液器进行添加，配置好好备用。

具体操作如下表所示：

注意：本实验用水均为去离子水

管号	标准品稀释液 (ml)	加入 1 ppm 高标		终浓度
1	6	0μl	定容到 10ml	0 ppb
2	6	40μl	定容到 10ml	4ppb
3	6	200μl	定容到 10ml	20ppb
4	6	800μl	定容到 10ml	80ppb
5	6	3ml	定容到 10ml	300ppb

## 八、样本前处理步骤

### 玉米、小麦、大米等粮食处理方法:

- 粉碎并取 5g 有代表性的样品置入 100ml 具塞三角瓶中, 加入 50ml 去离子水与其混合;
- 于振荡器上剧烈振荡 10 分钟, 转速为 150r/min; (或涡旋均 5min 以上);
- 取液体于 4000r/min 离心 5min(或静置 3min, 再用定量滤纸过滤);
- 取上清或滤液 1ml, 再加入 4ml 去离子水;
- 振荡 5s 或手摇匀, 取 50 $\mu$ l 进行分析。

**样品稀释倍数: 50 倍**

## 九、检测步骤

- 1、将所需试剂从冷藏环境中取出, 置于室温 (20~25℃) 平衡 30min 以上, 注意每种液体试剂使用前均须摇匀。
- 2、取出需要数量的微孔板, 将不用的微孔放入自封袋, 保存于 2~8℃。
- 3、洗涤工作液在使用前也需回温。
- 4、**编号:** 将样本和标准品对应微孔按序编号, 每个样本和标准品做 2 孔平行, 并记录标准孔和样本孔所在的位置。
- 5、**加标准品/样本:** 加标准品/样本 50 $\mu$ l 到对应的微孔中, 再加入呕吐毒素酶标物 50 $\mu$ l/孔, 最后加入呕吐毒素抗试剂 50 $\mu$ l/孔, 轻轻振荡混匀, 用盖板膜盖板后, 置 25℃ 环境中避光反应 15min。
- 6、**洗板:** 小心揭开盖板膜, 将孔内液体甩干, 向微孔内加入洗涤工作液 250 $\mu$ l/孔, 浸泡 10s, 然后甩干微孔内液体, 重复此操作四次, 最后用吸水纸拍干 (拍干后未被清除的气泡可用未使用过的枪头戳破)。
- 7、**显色:** 加入底物液 100 $\mu$ l/孔, 用盖板膜盖板后置室温避光环境反应 5min。
- 8、**测定:** 加入终止液 50 $\mu$ l/孔, 轻轻振荡混匀, 设定酶标仪于 450nm 处 (建议用双波长 450/630nm 检测, 请在 5min 内读完数据), 测定每孔 OD 值。 (若无酶标仪, 则不加终止液用目测法可进行判定)。

## 十、结果判定

结果判定有如下两种方法, 注意样本吸光值与其所含呕吐毒素成负相关。

### 1、粗略判定

用样本的平均吸光度值与标准值比较即可得出其浓度范围 (ppb)。假设样本 1 的吸光度值为 1.169, 样本 2 的吸光度值为 0.525, 标准液吸光度值分别是: 0 ppb 为 2.206; 200 ppb 为 1.617; 1000 ppb 为 1.049; 4000 ppb 为 0.579; 15000 ppb 为 0.236。则样本 1 的浓度范围是 200 ppb ~ 1000 ppb; 样本 2 的浓度范围是 4000 ppb ~ 15000 ppb。

### 2、定量分析

(1) 百分吸光率的计算, 标准品或样本的百分吸光率等于标准品或样本的百分吸光度值的平均值 (双孔) 除以第一个标准 (0 标准) 的吸光度值, 再乘以 100%, 即

$$\text{百分吸光度值 (\%)} = \frac{B}{B_0} \times 100\%$$

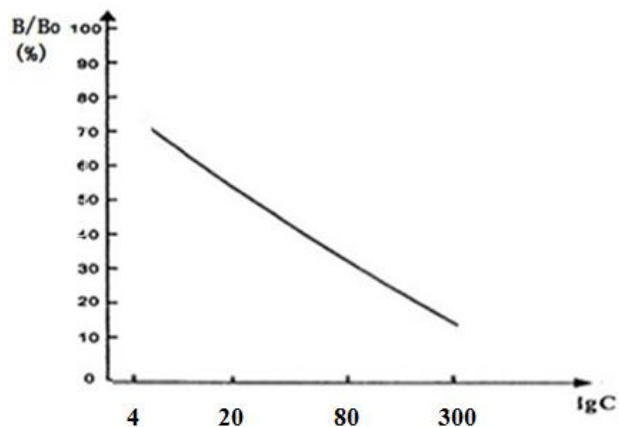
B—标准品或样本溶液的平均吸光度值

B<sub>0</sub>—0 (ppb) 标准品的平均吸光度值

### (2) 标准曲线的绘制与计算

以标准品百分吸光率为纵坐标, 以呕吐毒素标准品浓度 (ppb) 的半对数为横坐标, 绘制标准曲线图。将样本的百分吸光率代入标准曲线中, 从标准曲线上读出样本所对应的浓度, 乘以其对应的稀释倍数即为样本中呕吐毒素的实际量。

### (3) 标准曲线绘制样板



## 十一、检测方法灵敏度、准确度、精密度

### 样本最低定量限:

玉米、小麦、大米等粮食.....200ppb (μg/kg)

### 回收率:

玉米、小麦、大米等粮食.....95±15%

**精密度:** 试剂盒的变异系数均小于 10%

## 十二、贮藏条件及保存期

贮藏条件: 保存试剂盒于 2~8℃。

保存期: 该产品有效期为 12 个月。