

呕吐毒素 Deoxynivalenol (DON) 酶联免疫分析 (ELISA)

试剂盒使用说明书

本试剂盒仅供研究使用

1 使用目的: 本试剂盒用于饲料、鱼、虾和肉类组织 (如鸡、牛肉和猪肉), 鸡蛋、蜂蜜、牛奶、血清和尿样中呕吐毒素(Deoxynivalenol)残留的定量检测。

2 实验原理

本试剂盒采用竞争 ELISA 方法, 在微孔板包被有呕吐毒素(Deoxynivalenol)偶联抗原, 加入呕吐毒素(Deoxynivalenol)标准品或样品, 游离呕吐毒素(Deoxynivalenol)与微孔条上预包被的呕吐毒素(Deoxynivalenol)偶联抗原互相竞争抗呕吐毒素(Deoxynivalenol)抗体酶标记物, 用 TMB 底物显色, 加入终止液后颜色由蓝色变为黄色, 用酶标仪在 450nm 波长下进行检测, 吸光值与样品中呕吐毒素(Deoxynivalenol)含量成反比, 通过标准曲线计算样品中呕吐毒素(Deoxynivalenol)的含量。

3 试剂盒组成

- 3.1 预包被的呕吐毒素(Deoxynivalenol)偶联抗原的可拆酶标板: 1 块 (12 孔×8 条)。
- 3.2 呕吐毒素 (Deoxynivalenol) 标准品: 6 瓶 (1ml/瓶), 含量分别是: 0 ppb, 0.1 ppb, 0.3ppb, 0.9ppb, 2.7ppb, 8.1ppb。
- 3.3 抗呕吐毒素(Deoxynivalenol)抗体酶结合物: 1 瓶 (6ml)。
- 3.4 显色液 A: 1 瓶 (6ml)。
- 3.5 显色液 B: 1 瓶 (6ml)。
- 3.6 终止液: 1 瓶 (6ml), 2M 硫酸。
- 3.7 样本稀释液: 1 瓶 (10×, 6ml), 用于样品稀释用。
- 3.8 浓缩洗涤液: 1 瓶 (20×, 20ml), 用于洗板。
- 3.9 说明书一份。

4 需要而未提供的材料

- 4.1 设备
 - 4.1.1 波长450nm酶标仪。
 - 4.1.2 粉碎机。
 - 4.1.3 量筒。
 - 4.1.4 振荡器。
 - 4.1.5 漏斗。
 - 4.1.6 Whatman No 1 或相当的滤纸。
 - 4.1.7 微量移液器。
- 4.2 试剂
 - 4.2.1 去离子水或蒸馏水。
 - 4.2.2 甲醇。

5 贮存



武汉基因美科技有限公司

- 5.1 试剂盒贮存于2~8℃，切勿冷冻
- 5.2 未用完的微孔板应该密封干燥保存

6 注意事项

- 6.1 使用试剂盒前请仔细阅读说明书。
- 6.2 不要使用过期试剂盒。
- 6.3 试剂盒使用前，将试剂恢复至室温（25±2℃），建议至少回温2小时。
- 6.4 标准品中含有呕吐毒素(Deoxynivalenol)，使用时应特别注意，操作时应带手套。
- 6.5 终止液中含有硫酸，使用时防止灼伤皮肤及腐蚀衣物。
- 6.6 不同标准品、样品所用吸头不能混用，否则会影响试验结果。
- 6.7 不同批号试剂盒中的试剂不得混用；不同标准品、样品所用吸头不得混用，否则会影响实验结果。
- 6.8 稀释样本时必须用本试剂盒中的样本稀释液，否则会影响实验结果
- 6.9 混合试剂时应避免起泡。

7 工作液准备

- 7.1 呕吐毒素(Deoxynivalenol)标准品溶液：0 ppb, 0.1 ppb,0.3ppb,0.9ppb,2.7ppb,8.1ppb
- 7.2 浓缩洗涤液：用蒸馏水按1:20(1+19)稀释备用
- 7.3 样本稀释液：用蒸馏水按1:10(1+9)稀释备用
- 7.3 显色剂：已备用，避免光线直照
- 7.4 反应终止液：已备用

8 样品处理：（样品在提取过程中，要严格按说明书操作，提取过程中应准确稀释，否则会出现结果不准确，样品应当保存在阴凉避光之处及冷藏保存）

一般样品处理

- 8.1取10g粉碎的样品，加 20ml 70%甲醇溶液
- 8.2强力振荡3分钟
- 8.3用Whatman No 1滤纸过滤
- 8.4取100μl处理后的样品，加入400μl样本稀释液
- 8.5取100μl稀释液进行分析

动物组织前处理

- 8.6 准确称取 1±0.05 g 匀浆后的组织样品到 50 ml 的聚苯乙烯离心管中；加入 3ml 乙腈--丙酮提取溶液，2000rpm 剧烈震荡 20s 后 4000r/min 以上离心 5min
- 8.7 取上清液 0.8ml 在 50℃氮气流下吹干
- 8.8 加入 3.2mL 样品稀释液, 750rpm 涡旋 20s
- 8.9取100μl用于分析

饲料前处理方法

- 8.10 准确称取 1±0.05 g 粉碎饲料样品到 50 ml 的聚苯乙烯离心管中；加入 4ml 乙腈，1ml 丙酮，2000rpm 剧烈震荡 20s 后 4000r/min 以上离心 3min
- 8.11 取上清液 0.7ml 在 50℃氮气流下吹干
- 8.12加入2.8mL样品稀释液,涡旋20s，混匀后取100μl用于分析

牛奶前处理方法

- 8.13取1 ml牛奶样品到5 ml聚苯乙烯离心管中；加入4ml样品稀释液，混匀后取100μl用于分析

奶粉前处理方法



武汉基因美科技有限公司

8.14 准确称取 0.3g 奶粉样品到 7 ml 的聚苯乙烯离心管中；加入 2ml PBS 溶液，2 ml 正己烷，震荡混匀

8.15 4000r/min 以上离心 5min，去除有机层和中间层，取下层溶液 100 μ l 到 400 μ l 样品稀释液

8.16 混匀后取 100 μ l 用于分析

9 酶免分析步骤

9.1 实验须知

9.1.1 实验开始前请将所有试剂于盒外充分恢复至室温（25 \pm 2 $^{\circ}$ C），时间约2小时。回温至室温（25 \pm 2 $^{\circ}$ C）后再取出微孔条，多余的微孔条重新密封立即于2~8 $^{\circ}$ C干燥保存

注：一定保证回温充分，否则影响检测的精确度和准确度。

9.1.2 使用后请立即将试剂放回2~8 $^{\circ}$ C保存

9.1.3 请不要改变分析程序

9.1.4 请使用精确的微量移液器

9.1.5 操作一旦开始，请不要中断任何程序

9.1.6 ELISA结果的可重复性极大程度的取决于操作程序，请严格按照要求操作

9.1.7 为避免交叉污染，每个标准品和样品均应使用不同的吸头加样

9.1.8 加样时请勿让吸头接触微孔中的溶液或内表面

9.2 分析步骤

9.2.1 预先进行编号，标记B0、标准品和样品的位置，推荐进行双孔检测

9.2.2 取所需数量的微孔（微孔条可拆），将多余板条重新密封并立即放回2~8 $^{\circ}$ C保存

9.2.3 样品稀释液、浓缩洗涤液（20 \times ）稀释成工作液（蒸馏水或去离子水稀释）

9.2.4 在B0孔中加入50 μ l 10.0 ppb标准品溶液

9.2.5 在各标准孔中加入50 μ l的标准品溶液

9.2.6 在各样品孔中加入50 μ l样品溶液

9.2.7 在所有孔中加入50 μ l的抗呕吐毒素(Deoxynivalenol)抗体酶结合物

9.2.8 轻轻晃动反应板几秒钟。

9.3 37 $^{\circ}$ C温浴30min（温浴过程中不时轻拍反应板，可以减少双孔误差）

9.3.1 甩掉孔中液体，用洗液洗涤微孔板5次，最后一次应在吸水纸上拍打以完全除去孔中液体。

9.4 反应

9.4.1 洗涤程序完成后，立即用微量移液器在每个微孔中先加入50 μ l显色液A，再加 50 μ l显色液B；轻微晃动反应板使之彻底混匀

9.4.2 37 $^{\circ}$ C温浴10min

9.4.3 每孔中加入50 μ l终止液，混匀

9.4.4 在450nm下检测吸光度，结果在5min内读取。

10 结果计算

10.1 定量分析

10.1.1 所获得的每个浓度标准溶液和样本吸光度值的平均值（B）除以第一个标准（0标准）的吸光度值（B0）再乘以100%，即百分吸光度值。

B—标准溶液或样本溶液的平均吸光度值

B0—0 ppb标准溶液的平均吸光度值

武汉基因美科技有限公司

10.1.2以呕吐毒素(Deoxynivalenol)浓度的对数值为X轴，百分吸光度值为Y轴，绘制标准曲线图。根据样品百分吸光度值，可从曲线上得到对应点的横坐标，即为呕吐毒素(Deoxynivalenol)浓度的对数值，求得反对数即为测定液中呕吐毒素(Deoxynivalenol)浓度C (ppb)

10.1.3由于样品经过了预先稀释，因此根据标准曲线所得出的样品浓度一定要再乘以其稀释倍数。

10.2 半定量测定

10.1.1目测半定量测定：首先选择一个适当的标准液与样品同运行，根据样品与标准品颜色深浅比较，判断样品浓度值是小于还是大于标准值。

10.1.2仪器半定量测定：首先选择一个适当的标准液与样品同运行，根据样品与标准品吸光度值的高低比较，判断样品浓度值是小于还是大于标准值。

11 特异性

物质 交叉反应

呕吐毒素(Deoxynivalenol)100%

12 试剂盒参数

本试剂盒检测下限为0.1 ppb

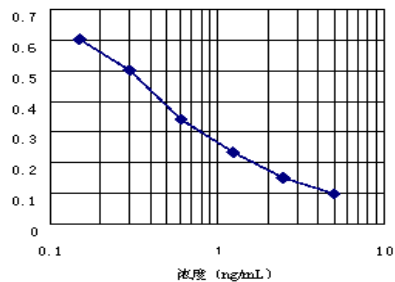
B0吸光度最佳值应大于1.0

试剂盒吸光度板内误差小于8%，板间误差小于15%。

用本说明书提供的组织样本提取方法回收率大于80%。

13 标准曲线模式（仅供参考）

试剂盒提供的标准曲线范围为 0.1 ppb ~8.1ppb 。



14 分析限制

本试剂盒检测为阳性的样品应该用另一种方法如HPLC或GC/MS加以确证。