

## 脱氧雪腐镰刀菌烯醇（DON）ELISA 快速检测试剂盒操作说明书

### 目 录

一、简介.....	2
二、试剂盒组成.....	2
三、贮存条件、规格及有效期.....	2
四、定量检测程序.....	2
五、限量（定性）检测程序.....	3
六、样品处理程序.....	3
七、自备仪器及试剂.....	4
八、国家标准.....	4
九、常见故障分析.....	4

贮存：2-8℃贮存，忌 0℃以下冻存，有效期 10 个月。

生产批号：见外包装盒

## 一、简介

本试剂盒采用间接竞争酶联免疫吸附 ELISA 原理快速定量检测小麦、玉米和饲料等样品中的脱氧雪腐镰刀菌烯醇 (Deoxynivalen, DON)。

小麦、玉米、饲料前处理包括：提取、过滤、稀释，处理时间大约为 20-40 分钟。

本试剂盒的检测限：0.2ppm；小麦、玉米、饲料中 DON 的回收率  $\geq 80\%$ ，批内、批间变异系数  $< 15\%$ 。

## 二、试剂盒组成

A. 24/48/96 孔 DON 酶标板:	3/6/12 条×8 孔
B. 20×浓缩洗涤液: 25ml (用蒸馏水稀释 20 倍使用)	1 瓶
C. DON 抗体: 2/4/6ml	1 瓶 (红盖)
D. 酶标二抗: 3/6/12 ml	1 瓶 (绿盖)
E. 显色液: 3/6/12 ml	1 瓶 (蓝盖)
F. 终止液: 3/6/12 ml	1 瓶 (黄盖)
G. DON 标准品: 1 ml/瓶 (0、500、1000、2000、4000ppb)	各 1 瓶
H. 操作说明书	1 份

**注意：**标准品含有 DON、终止液含  $2\text{NH}_2\text{SO}_4$ ，须小心取用。请勿在有限期外使用本试剂盒或不同批次的试剂混用。DON 标准品的实际浓度为 0、50、100、200 和 400ng/ml。

## 三、贮存条件、规格与有效期

2-8℃避光贮存，忌 0℃以下冻存，规格及有效期（生产批号）见试剂盒外包装。

## 四、定量检测程序

- 4.1 实验准备：**从冰箱取出试剂盒，恢复至室温后，打开自封袋，取出所需数量的板条插入微孔架，记录空白、DON标准品①②③④⑤号及样品的位置（可参照下表所示）。其余板条封口后放入冰箱。将20×浓缩洗涤液用超纯水或蒸馏水稀释20倍，待用。

	1	2	3...12
A	空白	样品	
B	标准品①	样品	
C	标准品②	样品	
D	标准品③	样品	
E	标准品④	样品	
F	标准品⑤	样品	
G	样品	样品	
H	样品	样品	

- 4.2 加样：**空白孔加入 100  $\mu\text{L}$  洗涤液(不加DON抗体)。DON标准品孔和样品孔相应地加入标准品(①②③④⑤)和样品待检液 50  $\mu\text{L}$ /孔（如上表所示加入），再加入DON抗体(50  $\mu\text{L}$ /孔)，此时各孔中溶液体积为 100  $\mu\text{L}$ 。将酶标板在水平桌面上轻微振荡（注意避免液体溅出）使之混匀，放入湿盒内(在有盖容器内放置一块平整湿纱布)，37℃温育30分钟。

**注意：**此操作步骤要快，尽量保持前后孔温育时间一致，每次加样须更换新的吸头。

- 4.3 **洗板:** 甩出孔中的液体, 用洗瓶或移液器将洗涤液加入各孔中(满孔)。再次甩出孔中液体, 将酶标板倒置在吸水纸上拍打以保证完全除去孔中的液体。再重复操作洗涤步骤三次(共洗四次)。
- 4.4 **加酶标二抗:** 将洗好的酶标板平放, 加入酶标二抗 100  $\mu$ l /孔, 置于湿盒内, 37 $^{\circ}$ C 温育 30 分钟。
- 4.5 **洗板:** 重复步骤 4.3 的操作;
- 4.6 **显色:** 将洗好的酶标板平放, 加入显色液 100  $\mu$ l /孔, 将酶标板置于湿盒内, 放入温箱内 37 $^{\circ}$ C 显色 5 分钟(若显色较浅, 可适当延长, 但不宜超过 10 分钟)。
- 4.7 **终止及测定:** 将显色完毕的板条取出, 加入终止液 50  $\mu$ l/孔, 轻微震荡混匀, 以空白孔调零, 在 450 nm 处测量吸光值 A (在加入终止液 5 分钟内读取吸光值)。
- 4.8 **结果判定:** 以 DON 标准品浓度 0.5ppm、1.0ppm、2.0ppm、4.0ppm 的常用对数值 (1gC) 为横坐标, 各浓度标准品相应的吸光值 A 与 0ppb 的标准品 A 值的比值 ( $B/B_0\%$ ) 为纵坐标 [ $B/B_0\% = \text{标准品 (或样品) 的吸光值} / 0\text{ppb 标准品的吸光值} \times 100\%$ ], 绘制标准曲线。根据样品孔的吸光值计算样品的  $B/B_0\%$  值, 查标准曲线, 可得到相应样品中 DON 的含量 (已考虑样品提取的稀释倍数, 结果无需换算)。(或可直接用 RADEWIN 等专用 ELISA 分析软件对数据进行分析得出结果)。如果检测结果高于检测上限, 请将待测样品提取液用超纯水或蒸馏水稀释后再检测, 测定结果乘以相应的稀释倍数。

## 五、限量(定性)检测程序

适用于同时定性检测多个限量标准不同的样品, 以 DON 标准品③号(1.0ppm)作参照进行定性比较, 不需作标准曲线。

- 5.1 **实验准备:** 从冰箱内取出试剂盒, 恢复至室温后, 打开锡箔袋, 取出所需数量的板条插入微孔架, 记录空白、DON 标准品③号(1.0ppm)及样品的位置, 其余板条封口后放入冰箱。
- 5.2 **反应:** 空白孔加入 100  $\mu$ l 洗涤液(不加 DON 抗体)。DON 标准品孔和样品孔相应地加入标准品③(1.0ppm)和待检样品提取液各 50  $\mu$ l/孔, 再加入 DON 抗体(50  $\mu$ l /孔), 此时各孔中溶液体积为 100  $\mu$ l。将酶标板在水平桌面上轻微振荡(注意避免液体溅出), 使之混匀。放入湿盒内(在有盖容器内放置一块平整湿纱布), 37 $^{\circ}$ C 温育 30 分钟。  
**注意:** 此操作步骤要快, 尽量保持前后孔温育时间一致, 每次加样须更换新的吸头。
- 5.3 **洗板:** 参照 4.3
- 5.4 **加酶标二抗:** 参照 4.4
- 5.5 **洗板:** 参照 4.3;
- 5.6 **显色:** 参照 4.6
- 5.7 **终止及测定:** 参照 4.7 (目测法不加终止液)
- 5.8 **结果判定:** 目测法(未加终止液前目测): 比较样品孔与标准品参照孔的颜色, 若显色比标准品参照浅者, 则为阳性, 样品中 DON 的含量超出限量标准; 若深者, 则为阴性; 若颜色接近, 则需用酶标仪测吸光值比较。仪器法: 酶标仪检测在 450nm 波长处各孔的吸光值 A, 若样品的 A 值 < 标准参照的 A 值, 为阳性, 表示样品中 DON 的含量超出限量标准; 若样品 A 值  $\geq$  标准参照 A 值, 为阴性。

## 六、样品处理程序

- 6.1 脂肪含量低的固体样品(如大米、玉米、小麦等)

- 称取 5 g 粉碎样品于 100 ml 带塞三角瓶内，准确加入 25ml 超纯水或蒸馏水。
- 将加入水的样品放入振荡器内（或用手强力振荡），充分振荡 3 分钟后用定性滤纸过滤，收集滤液。
- 取滤液 4ml，加入 4ml 超纯水或蒸馏水，混匀（若浑浊用滤纸过滤），此为待检样品提取液。

## 6.2 啤酒、麦芽汁

- 取 5ml 样品于 100ml 带塞三角瓶内，准确加入 45ml 超纯水或蒸馏水，混匀，用定性滤纸过滤，该溶液为样品待检液

注意：1) 某些样品待检液久置影响检测结果的准确性，为保证检测的准确性，样品提取后请即时检测。

- 2) 若样品待检液不立即检测，请将其存储于棕色玻璃瓶内，2-8℃避光保存。
- 3) 试剂盒在使用前，请将试剂盒内所有试剂放到室温（20-25℃）进行温度平衡试剂用完后立即将其放置回2-8℃冰箱内保存。
- 4) 在每个步骤操作时，速度要快，不要使板孔暴露在空气中时间过久，避免酶标板变干。未用完的酶标板需密闭于自封袋内，防止受潮且避光保存于2-8℃冰箱内。
- 5) 在温育时，避免光照，建议将酶标板置于湿盒内（在有盖容器内放置一块平整湿纱布）进行温育。
- 6) 若样品数量超过20份，请用多通道加样器操作。

## 七、 自备仪器及试剂

1. 酶标仪（内置 450nm 滤光片）或黄曲霉专用测定仪。
2. 20-200ul 微量移液器及配套吸头
3. 恒温培养箱（0℃-50℃）、冰箱、感量 0.01g 的天平、小型粉碎机或碾钵
4. 玻璃器皿：三角瓶、烧杯、分液漏斗、蒸发皿、量筒、具塞试管、滴管、移液管等
5. 其他：甲醇、滤纸、吸水纸等

## 八、 国家标准

标准名称	标准号	实施日期	适用范围	指标(μg/kg)
食品中脱氧雪腐镰刀菌烯醇允许量标准	GB2761-2011	2011-10-20	谷物及其制品	
			玉米、玉米面（渣、片）； 大麦、小麦、麦片、小麦粉；	≤1000 ≤1000
饲料卫生标准	GB13078-2001	2001-10-1	猪配合饲料、犍牛配合饲料、泌乳期动物配合饲料；	≤1000
			牛配合饲料、家禽配合饲料；	≤5000

## 九、 常见故障分析

	问题及现象	原因	解决办法
1	整块板反应未产生颜色或整体吸光度值偏低	<ol style="list-style-type: none"> <li>1. 被检测物污染了处理样品用的容器。</li> <li>2. 由于重复使用吸头导致抗体污染了酶标记物</li> <li>3. 室温过低或试剂未回室温</li> <li>4. 洗涤水未回升到室温</li> <li>5. 试剂过有效期</li> <li>6. 试剂失效</li> </ol>	<ol style="list-style-type: none"> <li>1. 注意妥善处理装标准液的瓶子及被检测物纯品试剂，不要与样品瓶同水槽洗涤</li> <li>2. 不要重复使用吸头</li> <li>3. 控制室温至 20-25℃ 并确保试剂回室温</li> <li>4. 使洗涤水回升至室温</li> <li>5. 更换新批号的试剂盒</li> <li>6. 与我公司联系</li> </ol>
2	整行或整列板孔最终反应颜色异常	<ol style="list-style-type: none"> <li>1. 手工洗板时相对应的吸头与移液器接触不严，导致空吸或吸液量不够</li> <li>2. 洗板机洗板时相对应的管路阻塞，导致未注入洗涤用水或水量不够</li> </ol>	<ol style="list-style-type: none"> <li>1. 洗板前检查吸头是否牢固，是否高矮一致且在一条直线上</li> <li>2. 检查管路是否阻塞，检查注水量是否充分</li> </ol>
3	标准曲线不成良好的 S 型	<ol style="list-style-type: none"> <li>1. 手工洗板步骤失败，洗涤液被板孔中洗涤物污染</li> <li>2. 洗板机洗板步骤失败，洗板次数不够及注水量不够</li> <li>3. 洗板后未立即进行下一步操作，中间间隔过长</li> <li>4. 孔中含有两种以上的试剂时未能充分混匀</li> </ol>	<ol style="list-style-type: none"> <li>1. 在微孔板上板面上方约 0.5cm 处打出洗涤水，避免注入板孔中的液体接触到移液器管尖而将孔中物质带回到洗涤液中</li> <li>2. 洗板机洗板的注水量为 400μL，注水后的液面应该接近板平面并且洗涤四次以上</li> <li>3. 洗板后立即进行下一步操作，不要中断轻轻振荡板并在桌面上做圆周运动以混匀或用振荡器混匀</li> </ol>
4	零标准的吸光度接近或低于第二标准吸光度值	<ol style="list-style-type: none"> <li>1. 洗板后未立即进行下一步操作，中间间隔过长导致板孔干燥</li> <li>2. 试剂盒或试剂回温不够</li> </ol>	<ol style="list-style-type: none"> <li>1. 洗板后立即进行下一步操作，不要中断</li> <li>2. 确保试剂及洗涤水回升至 20-25℃</li> </ol>
5	整块板最终反应颜色的吸光度值都很高	<ol style="list-style-type: none"> <li>1. 酶标记物污染了盒内的其它试剂，吸过酶标记物的吸头再次使用</li> </ol>	<ol style="list-style-type: none"> <li>1. 不要重复使用吸头</li> </ol>
6	平行性不好	<ol style="list-style-type: none"> <li>1. 加样量是否准确</li> <li>2. 加样及加样操作是否正确</li> <li>3. 洗板问题</li> </ol>	<ol style="list-style-type: none"> <li>1. 使用较好的移液器及吸头</li> <li>2. 正确加样</li> <li>3. 参阅问题 3 中，洗板问题的阐述</li> </ol>

总部地址：山西省太原市高新区长治路 227 号高新国际 1302 室 邮编：030006  
电 话：0351-7435555 传 真：0351-7435555 Http://defcred.cn.alibaba.com

研发中心：江西省南昌市南昌大学北区中德联合研究院 邮编：330047  
电 话：0791-88305965 技术服务热线：0791-88305177 转 8222