呕吐毒素检测试剂盒使用说明书

（酶联免疫法）

1 原理及用途

脱氧雪腐镰刀菌烯醇又称呕吐毒素，由禾谷镰刀菌产生，常出现在玉米（穗腐病）、小麦和大麦（赤霉病）上。我国谷物中 DON 的限量标准为 1.0mg / kg。

本试剂盒采用间接竞争 ELISA 方法检测大米、玉米、小米等谷物及饲料样本中的呕吐毒素(Deoxynivalenol，DON)，试剂盒由预包被偶联抗原的酶标板、辣根酶标记物、抗体、标准品及其他配套试剂组成。检测时，加入标准品或样本溶液，样本中的呕吐毒素和酶标板上预包被偶联抗原竞争抗呕吐毒素抗体，加入酶标记物后，用 TMB 底物显色，样本吸光度值与其所含呕吐毒素含量成负相关，与标准曲线比较即可得出样本中呕吐毒素的残留量。

2 技术指标

2.1 试剂盒灵敏度：3ppb (ng/ml)

2.2 反应模式：37℃， 30min～30min～15min

2.3 检测下限：

谷物、饲料……150ppb

玉米皮、麦麸等吸水性强的样本…300ppb

2.4 交叉反应率：

呕吐毒素……100%

3-乙酰基脱氧雪腐镰刀菌烯醇……<1%

2.5 样本回收率：

谷物、饲料……85%±15%

玉米皮、麦麸等吸水性强的样本…75%±15%

3 试剂盒组成

酶标板……96 孔

标准品（黑盖）：各 1ml

0ppb、3ppb、9ppb、27ppb、81ppb、243ppb

酶标记物……11ml

抗体工作液……5.5ml

底物液 A……6ml

底物液 B……6ml

终止液……6ml

20×浓缩洗涤液……40ml

2×浓缩复溶液……50ml

说明书……1 份

盖板膜……1 张

自封袋……1 个

4 需要的器材和试剂

4.1 仪器：酶标仪、打印机、均质器、振荡器、离心机、恒温培养箱、天平（感量 0.01g）

4.2 微量移液器：单道 20μl-200μl、100μl-1000μl，多道 300μl

5 样本前处理

5.1 样本处理前须知：

实验器具必须洁净并使用一次性吸头，以避免污染干扰实验结果。

5.2 配液：

配液 1：复溶液

将 2×浓缩复溶液用去离子水 2 倍稀释(1份 2×浓缩复溶液加入 1 份去离子水)，用于样本的复溶，复溶液在 4℃环境可保存一个月。

配液 2：工作洗涤液

将 20×浓缩洗涤液 20 倍稀释(1份 20×浓缩洗涤液加入19 份去离子水)。

5.3 样本前处理步骤：

5.3.1 谷物（大米、玉米、小米等）及饲料处理方法

1）称取 2g ±0.05g 粉碎样本于 50ml 离心管中，加入 10ml 去离子水，振荡 5min，室温 4000r/min 离心 10min；

2）取 0.1ml 上清，加入 0.9ml 复溶液（配液 1），混匀；

3）取 50μl 进行分析。

样本稀释倍数：50　　检测下限：150ppb

5.3.2 玉米皮、麦麸等吸水性强的样本处理方法

1）称取 2g ±0.05g 粉碎样本于 50ml 离心管中，加入 20ml 去离子水，振荡 5min，室温 4000r/min 离心 10min；

2）取 0.1ml 上清，加入 0.9ml 复溶液（配液 1），混匀；

3）取 50μl 进行分析。

样本稀释倍数：100　　检测下限：300ppb

（对于毒素含量极高的样本可用复溶液（配液 1）进一步稀释后再测。比如取 5.3.2 的 2 步骤中的已混匀的混合液 0.1ml加入复溶液（配液 1）0.9ml 混匀，最终样本稀释倍数为 1000，检测下限为 3000ppb。）

6 酶联免疫试验步骤

将所需试剂从 4℃冷藏环境中取出，置于室温平衡30min以上，洗涤液冷藏时可能会有结晶需恢复到室温以充分溶解，每种液体试剂使用前均须摇匀。取出需要数量的微孔板及框架，将不用的微孔板放入自封袋，保存于 2-8℃。

6.1 **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。

6.2 **加样反应**：加入标准品或样本 50μl/孔到各自的微孔中，然后加入抗体工作液 50μl/孔，轻轻振荡 5 秒混匀，37℃反应30min。

6.3 **洗　　涤**：小心揭开盖板膜，甩去孔内液体，每孔加入

350μl **工作洗涤液**，静置 30 秒后弃去，重复洗涤 5 次，最后一次拍干（用吸水纸拍干，拍干后未被清除的气泡可用干净的枪头刺破）。

6.4 **加酶反应**：加入酶标记物 100μl/孔，37℃反应 30min。

6.5 **洗　　涤**：同上

6.6 **显　　色**：加入底物液 A 50μl/孔，再加入底物液 B 50μl/孔，轻轻振荡 5 秒混匀，37℃避光显色 15min（若蓝色过浅，

可适当延长反应时间）。

6.7 **终　　止**：加入终止液 50μl/孔，轻轻振荡混匀，终止反应。

6.8 **测吸光值：**用酶标仪于 450nm 处测定每孔吸光度值（建议用双波长 450/630nm）。测定应在终止反应后 10min 内完成。

7 结果分析

7.1 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吸光度值的平均值（双孔）除以第一个标准品（0ppb）的吸光度值的平均值（双孔），再乘以 100%，即

$$\text{百分吸光率（\%）} = \frac{A}{A0} \times 100\%$$

A—标准品或样本溶液的平均吸光度值A0—0ppb 标准品的平均吸光度值

7.2 标准曲线的绘制与计算

以标准品百分吸光率为纵坐标，对应的标准品浓度（ppb）

的对数为横坐标，绘制标准品的半对数曲线图。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待测物的实际浓度。若利用试剂盒专业分析软件进行计算，更便于大量样本的准确、快速分析。

8 注意事项

8.1 室温低于 25℃或试剂及样本没有回到室温（25℃）会导致所有标准的OD 值偏低。

8.2 在洗板过程中如果出现板孔干燥的情况，则会出现标准曲线不成线性，重复性不好的现象。所以洗板拍干后应立即进行下一步操作。

8.3 混合要均匀，洗板要彻底，在 ELISA 分析中的再现性，很大程度上取决于洗板的一致性。

8.4 在所有孵育过程中，用盖板膜封住微孔板，避免光线照射。

8.5 不要使用过了有效期的试剂盒，不要交换使用不同批号试剂盒中的试剂。

8.6 显色液若有任何颜色表明变质，应当弃之。0 标准的吸光度值小于 0.5 个单位（A450nm< 0.5 ）时，表示试剂可能变质。

8.7 反应终止液有腐蚀性，避免接触皮肤。

9 贮藏及保存期

储藏条件：试剂盒于 2-8℃保存，避免冷冻。

保 质 期：该产品有效期为 1 年，生产日期见包装盒。