



酶联免疫法测定脱氧雪腐镰刀菌烯醇

(code HU0040009/HU0040029)

Celer DON v3 是用于脱氧雪腐镰刀菌烯醇定量分析的酶联免疫试剂盒。试剂盒包含 96 孔 (code HU0040009) 和 48 孔 (code HU0040029) 测试所需的试剂，包括标准品。需要实验室配备酶标仪。

检测范围

谷物、饲料、DDGS、麦麸和次粉。

样品前处理

- 谷物 (玉米, 小麦)、饲料、DDGS: 研磨, 甲醇水提取, 过滤, 稀释 (可选)。
- 硬质小麦: 研磨, 水提取, 离心, 稀释。
- 麦麸和次粉: 水提取, 活性炭净化, 过滤, 稀释。

检测时间: 20 分钟 (不包括样品前处理)。

检出限

玉米, 小麦, 饲料, DDGS: 0.04 ppm

硬质小麦: 0.12 ppm

麦麸和次粉: 0.24 ppm

特异性

化合物	交叉反应率 %
3-乙酰基-DON	>100
DON	100
3-葡萄糖基-DON	64±16
15-乙酰基-DON	2
雪腐镰刀菌烯醇	<4

1 测试原理

该测试是在包被有特异性抗 DON 抗体的微孔板中进行。在预混合孔中, 将酶标记的 DON 和标准溶液或样品混合, 然后转移到包被有抗 DON 抗体的微孔板中。

在第一次孵育期间, 标准溶液/样品中的游离脱氧雪腐镰刀菌烯醇和酶标记的脱氧雪腐镰刀菌烯醇竞争固相上的抗 DON 抗体结合位点, 然后在洗涤步骤中除去任何未结合的酶耦合物和 DON 分子。加入固定量的生色底物将无色色原体转化为蓝色产物。添加终止试剂会导致颜色从蓝色变为黄色, 用酶标仪在 450nm 处测量吸光度。溶液颜色的深浅与标准溶液/样品中的脱氧雪腐镰刀菌烯醇浓度成反比。

2 提供的试剂

微孔板: 包被抗 DON 抗体, 装于带有干燥剂的铝箔袋中。

Code HU0040009: 96 孔; Code HU0040029: 48 孔。

预混合孔板: 未经包被的空白孔。

Code HU0040009: 96 孔; Code HU0040029: 48 孔。

微孔板可独立拆分, 单独使用。

DON 标准品: 5 瓶, 浓度分别为: 0 ppm; 0.04ppm;

0.25 ppm; 1.25 ppm; 5 ppm

酶耦合物: 1 瓶。

Code HU0040009: 14 ml; code HU0040029: 8 ml。

洗涤缓冲液 10x: 1 瓶。

发展液: 1 瓶。

Code HU0040009: 14 ml; code HU0040029: 8 ml。

终止液: 一个白色盖子的玻璃瓶。

Code HU0040009: 8 ml; code HU0040029: 6 ml。

3 需准备的材料 (未提供)

- 天平
- 霉菌毒素提取液 A (code Tecna ME070) 或 70% 甲醇 (小麦, 玉米, 饲料); 100% 甲醇 (硬质小麦, 麦麸和次粉)。
- 活性炭 (Sigma C3345)。
- 蒸馏水或去离子水
- NaCl (小麦, 玉米, 饲料)
- 粉碎机或研磨器
- 振荡器 (可选)

- 离心机 (硬质小麦) 或滤纸 (Whatman 1) (小麦, 硬质小麦, 玉米, 饲料); 玻璃纤维过滤器 (Whatman 934AH) (麦麸和次粉)。

实验器材

- 20-200 µl 微量可调移液器
- 50-300 µl 微量可调多通道移液器
- 吸水纸
- 酶标仪 (450nm)。

4 使用者注意事项

- 该产品仅供体外诊断使用。
- 部分试剂含有防腐剂, 终止液含有硫酸并且有刺激性; 标准品中包含甲醇而易燃。
- 小心处理试剂, 避免接触皮肤、眼睛和黏膜。
- TECNA 网站上提供安全数据表。

5 处理和存储说明

- 将试剂盒存储在 2~8° C, 不能冷冻。
- 将未使用的微孔板放回到有干燥剂的铝箔袋中。
- 不要使用过期的产品。
- 不要混合不同试剂盒内的试剂。
- 严格按照试剂盒内附带的说明书进行操作。

6 样品处理

6.1 小麦, 玉米和饲料

- 充分混匀待测样品。
- 细细粉碎样品。
- 称取粉碎后的样品, 选择下表中描述的任何一项

样品	NaCl	提取液
50 g	10 g	250 ml 70% 甲醇
5 g	1 g	25 ml 70% 甲醇
50 g	/	250 ml (70% 甲醇, 4% NaCl*)
5 g	/	25 ml (70% 甲醇, 4% NaCl*)

*用 70% 甲醇 和 4% NaCl 制备提取溶液:

100 ml 溶液为例: 将 4 克 NaCl 溶解在 20ml 去离子水或蒸馏水中, 加入 70 ml 甲醇, 然后加入去离子水或蒸馏水至 100ml。

- 充分振荡 3 分钟。注意: 建议手动或通过温和的提取系统进行摇动; 使用磁力搅拌器、涡旋混合器会使检测结果偏高。
- 过滤样品并收集滤液, 样品的测量范围为 0.04-5 ppm。
- 如果样品浓度 >5 ppm, 将滤液在 70% 甲醇中稀释 5 倍 (1 份滤液 + 4 份 70% 甲醇溶液), 以获得 0.2-25 ppm 的测量范围。

为了使样品更具有代表性, 建议选择称取 50g 样品的方式。

6.2 硬质小麦

- 充分混匀待测样品。
- 细细粉碎样品
- 称取 50 g 粉碎后的样品添加 250 ml 蒸馏水。**另外:** 称取 5g 粉碎后样品, 加入 25ml 蒸馏水。

- 充分振荡 15 分钟。注意: 建议手动或通过温和的提取系统进行摇动; 使用磁力搅拌器、涡旋混合器会使检测结果偏高。
- 过滤样品并收集滤液。注意: 过滤过程比较缓慢, 建议过滤前让样品先沉淀下来, 作为替代方案, 我们建议以 3500g 离心样品 5 分钟并回收上清液。
- 用 100% 甲醇 1:3 稀释滤液 (例如 100 µl 滤液+200 µl 100% 甲醇)。样品的检测范围为 0.12-15 ppm。
- 如果样品浓度 >15 ppm, 将滤液在 70% 甲醇中稀释 5 倍 (1 份滤液 + 4 份 70% 甲醇溶液), 以获得测量范围 0.6 -75 ppm。

为了使样品更具有代表性, 建议选择称取 50g 样品的方式。

6.3 DDGS

- 充分混匀待测样品。
- 细细粉碎样品。
- 称取 50 g 粉碎后的样品并添加 250 ml 70% 甲醇溶液。**另外:** 称取 5 g 粉碎后的样品并添加 25 ml 70% 甲醇溶液。
- 彻底摇晃或振荡 15 分钟。
- 过滤样品 (Whatman 1) 并收集滤液。样品的测量范围为 0.04-5 ppm。
- 如果样品浓度 >5 ppm, 将滤液在 70% 甲醇中稀释 5 倍 (1 份滤液 + 4 份 70% 甲醇溶液), 以获得测量范围 0.2-25 ppm。

为了使样品更具有代表性, 建议选择称取 50g 样品的方式。

6.4 麦麸和次粉

- 充分混匀待测样品。
- 称取 10 g 样品并添加 100 ml 蒸馏水。
- 充分振荡 3 分钟。注意: 建议手动或通过温和的提取系统进行摇动; 使用磁力搅拌器、涡旋混合器会使检测结果偏高。
- 静置样品。
- 在含有活性炭 (Sigma C3345) 的小瓶中转移上清液, 1ml 样品提取液使用 2mg 活性炭, 例如: 称取 10 mg 活性炭添加 5 ml 样品提取液。
- 彻底振荡 30 秒。
- 在玻璃纤维过滤器上立即过滤样品 (Whatman 934AH), 并收集滤液。
- 用 100% 甲醇 1:3 稀释滤液 (1 份滤液+2 份 100% 甲醇), 使样品的测量范围达到 0.24-30 ppm。

7 实验前的准备工作

DON 标准品: 即时使用。

酶耦合剂: 即时使用。

洗涤缓冲液: 使用前用蒸馏水 1:10 稀释 (1 份洗涤缓冲液 +9 份蒸馏水); 注意: 在晶体存在的情况下, 将溶液在室温下搅拌并完全溶解。

稀释的洗涤缓冲液在室温下保存 24 小时, 在 2-8 °C 下保存两周。

发展液: 即时使用; 溶液对光敏感, 需避光保存。

终止液: 即时使用。注意: 该溶液包含 1 M 硫酸, 小心轻放, 如遇接触, 请用自来水彻底冲洗。

8 分析步骤

8.1 初步准备

- 使用前将所有试剂置于室温，并在室温下保持至少 1 小时。
- 使用后应立即将剩余试剂放于 +2/+8 °C 环境中。
- 不要更改实验步骤，特别是：
 - 不要延长第一步的孵育时间；
 - 不要在高于 25°C 和低于 18°C 的环境中孵育微孔板；
 - 孵育期间不要摇动微孔板；
 - 使用精确的微量移液器和配套枪头。
- 一旦开始实验，应不间断的完成所有实验步骤。
- ELISA 结果的可重复性在很大程度上取决于洗涤微孔板的效率和均匀性；始终遵循说明书中的所述程序。
- 每个标准品和样品使用新的一次性吸头，以避免交叉污染。
- 不要让吸头接触微孔中已有的液体。
- **在所有孵育期间避免阳光直射。** 不能使用密封胶带覆盖微量滴定板。

8.2 分析步骤

1. 预先安排好实验流程，记录好每个标准品/样品的位置，如果条件允许，建议做平行实验。把未使用的微孔条放回原来有干燥剂的铝箔袋中，并用夹子夹好。同时也准备好同样数量无包被抗体的空白预混合孔。
注意：建议在每次测定中不超过 48 孔（包括标准品）；如果不使用多道移液器，则建议在每次测定不超过 16 孔（包括标准品）。
2. 添加 100 µl 酶耦合物到每个预混合孔中。
3. 添加 50 µl 标准品/样品到相应的预混合孔中。
使用微量移液枪，混合每个预混合孔的内容物（移液器上下三次），立即将 100ul 转移到相应的抗 DON 抗体包被的微孔中。
4. 室温孵育 10 分钟；
不要延长第一步的孵育时间，在孵育过程中不要摇动微孔板。
5. 洗板
 - 孵育结束后倒掉孔中的液体；
 - 用稀释后的洗涤缓冲液填满微孔，倒掉微孔中的液体。重复清洗步骤三次；
 - 将微孔板倒扣在吸水纸上并轻轻敲打，清除残留的液滴。
不要让微孔变干
7. 发展
 - 添加 100 µl 发展液到每个微孔中，彻底混合几秒钟；
8. 室温下避光孵育 10 分钟。
9. 添加 50 µl 终止液到每个微孔中，并彻底混合。
10. 在 450 nm 处测定吸光度值，在 15 分钟内读数。

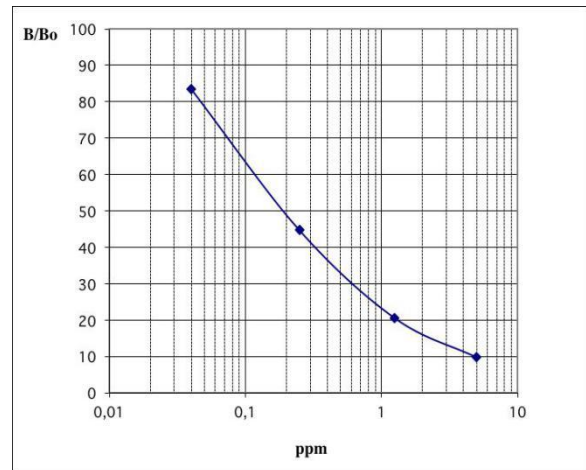
9 结果计算

- 将每个标准品和样品的吸光度值除以标准 0 (B₀) 的吸光度值并乘以 100；因此，最大结合 (B₀) 等于 100%，吸光度值以百分比表示：

$$\frac{\text{标准品吸光度值(或样品)}}{\text{零标准品吸光度值}} \times 100 = \frac{B}{B_0} (\%)$$

- 根据每个标准品的 B/B₀ 值和 DON 标准品浓度绘制标准曲线；
- 将每个样品的 B/B₀ 值插入校准曲线中得到相应浓度，标准品浓度 (ppb) 已经考虑了样品稀释因子：
 - 小麦,玉米,DDGS 和饲料：在标准曲线上读取的值对应于样品中的 DON，因为标准浓度已经考虑了样品稀释因子；
 - 硬质小麦：将校准曲线上读取的值乘以稀释因子 3；
 - 麦麸和次粉：将校准曲线上读取的值乘以稀释因子 6；
 - 所有样品：如果提取物被进一步稀释 5 倍以获得更大的剂量范围，则将结果乘以因子 5。

10 标准曲线示例



11 结果评估

在结果出具之后，有必要验证测定性能。通过将获得的数据与试剂盒中给出的数据进行比较来执行验证。如果值超出给定的数据，建议检查试剂盒的失效日期，吸光度记录的波长以及所用的程序。如果没有出现操作错误，请联系我们的技术支持。

12 试剂盒参数

12.1 分析参数

Bo 吸光度	≥ 0.7 OD _{450nm}
B/B ₀ 50%	0.06-0.5 ppm

12.2 分析性能

LOQ	小麦, 玉米, 饲料: 0.125 ppm 硬质小麦: 0.25 ppm
-----	---

13 参考文献

- Righetti L., Galaverna G. & Dall'Asta C Group detection of DON and its modified forms by an ELISA kit. *Food Additives & Contaminants: Part A*, 2017, Volume 34 – Issue 2: 248-254.
- L. Righetti, G. Rosar, M. Paleologo, C. Dall'Asta Group detection of DON and metabolites by an ELISA kit. Poster presentation at 7th International Symposium on Recent Advances in Food Analysis, 2015, November 3-6, Prague, Czech Republic.
- G. Rosar, B. Puppini, V. Bassani, L. Persic Monitoring the performances of Tecna's ELISA test kits for mycotoxins through proficiency test participation. Poster presentation at 7th International Symposium on Recent Advances in Food Analysis, 2015, November 3-6, Prague, Czech Republic.
- G. Rosar, F. Gon, F. Diana. Mycotoxins screening in maize by immunoassays: how extraction might affect the accuracy of results. Poster presentation at 6th International Symposium on Recent Advances in Food Analysis, 2013, November 5-8, Prague, Czech Republic.
- G. Rosar, L. Persic, F. Gon, B. Puppini, V. Bassani, F. Diana. Analysis of mycotoxins in complex matrices by enzyme immunoassays. Poster presentation at 35th Mycotoxin Workshop, 2013, 22-24 May, Ghent, Belgium.
- F. Gon, G. Rosar, E. Paoluzzi, F. Diana. Mycotoxin poly-contamination in maize: fast and sensitive ELISA test kits for a multi-analytical screening. Poster presentation at RME 2013, 21-23 January, Noordwijkerhout, the Netherlands.
- F. Diana, G. Rosar, E. Paoluzzi, E. Bianco, L. Persic, M. Paleologo. Rapid screening tools for the quantitative detection of deoxynivalenol in wheat: a comparative study between lateral flow and ELISA performances. Poster presentation at WMF meets IUPAC, 5-9 Novembre 2012, Rotterdam, the Netherlands.
- Rapid and sensitive DON mycotoxin assay comparison on wheat, durum wheat and corn
- F. Diana, G. Rosar, L. Persic and M. Paleologo. Food and Beverage Text Expo, 8 -10 February 2011, Cologne, Germany.
- L. Righetti, G. Rosar, M. Paleologo Oriundi, C. Dall'Asta. Determination of deoxynivalenol and its modified forms by ELISA kit. Poster presentation at 5th National Congress "Mycotoxins in agri-food chain". Istituto Superiore di Sanità, 2015, September 28-30, Rome, Italy.

14 责任

使用试剂盒评估为阳性的样品必须用确认方法重新测试。对由于不正确使用该试剂盒而导致的任何客户损失以及因结果而采取的任何行动不承担任何责任。