

己烯雌酚类检测试剂盒使用说明书

(酶联免疫法)

1 原理及用途

己烯雌酚是甾类同化激素，被大量用于促进反刍动物的生长。但由于己烯雌酚存在明显的致癌性，欧美等发达国家已相继禁止或严格禁止使用。我国农业部第 235 号文件中规定，动物源性食品中己烯雌酚的残留限量为不得检出。

本试剂盒采用间接竞争 ELISA 方法检测尿样、组织、饲料等样本中的己烯雌酚 (Diethylstilbestrol, DES)，试剂盒由预包被偶联抗原的酶标板、酶标记物、抗体、标准品及其他配套试剂组成。检测时，加入标准品或样品溶液，样本中的己烯雌酚和酶标板上预包被偶联抗原竞争抗己烯雌酚抗体，加入酶标记物后，用 TMB 底物显色，样本吸光度值与其所含己烯雌酚含量成负相关，与标准曲线比较即可得出样本中己烯雌酚的残留量。

2 技术指标

2.1 试剂盒灵敏度: 0.1ppb(ng/ml)

2.2 反应模式: 37°C, 30min~30min~15min

2.3 检测下限:

组织(虾、鱼)	0.2ppb
猪肉/肝、鸡肉/肝	2ppb
配合饲料	10ppb
浓缩/预混饲料	20ppb
尿液	0.6ppb

2.4 交叉反应率:

己烯雌酚	100%
双烯雌酚	38.5%
己烷雌酚	8.5%
己炔雌二醇	<0.1%
雌三醇	<0.1%

2.5 样本回收率:

尿 样	70%±10%
组 织	85%±10%
饲 料	90%±10%

3 试剂盒组成

酶标板	96 孔
标准品: 各 1ml	
0ppb、0.1ppb、0.3ppb、0.9ppb、2.7ppb、8.1ppb	
酶标记物(红盖)	11ml
抗体工作液(蓝盖)	5.5ml
底物液 A(白盖)	6ml
底物液 B(黑盖)	6ml
终止液(黄盖)	6ml
20X 浓缩洗涤液(白盖)	40ml

5X 复溶液（黄盖）.....50ml

说明书.....1 份

4 需要的器材和试剂

4.1 仪器：酶标仪、打印机、均质器、氮气吹干装置、振荡器、离心机、刻度移液管、天平（感量 0.01g）

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

4.3 试剂：乙腈、氢氧化钠、氯仿、丙酮、浓磷酸（含量 85%）

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 1：6M H₃PO₄ 溶液

100ml 浓 H₃PO₄（含量 85%）加去离子水 150ml 混合均匀。

配液 2：2M NaOH 溶液

8gNaOH 加去离子水 100ml 溶解。

配液 3：1M NaOH 溶液

4g NaOH 加去离子水 100ml 溶解。

配液 4：乙腈-丙酮混合液

V 乙腈：V 丙酮=4:1

配液 5：复溶液

将 5×复溶液用去离子水 5 倍稀释，用于样本的复溶，复溶液在 4℃环境可保存一个月。

5.3 样本前处理步骤：

5.3.1 组织（鸡、鸭、猪肉/猪肝、虾、鱼）样本处理方法

- 1) 称取 2±0.05g 匀浆后的样本，加入 6ml 乙腈-丙酮混合液，振荡 2min，15℃4000r/min 离心 10min；
- 2) 取 3ml 上清液，60℃氮气/空气吹干；
- 3) 加入 0.5ml 氯仿，振荡 20s，加入 2ml 2M NaOH，振荡 30s，4000r/min 离心 5min；
- 4) 取上清液 1ml，加入 200μl 6M H₃PO₄，振荡 5s；
- 5) 加入 3ml 乙腈萃取，振荡 2min，室温 4000r/min 离心 10min，取上层有机相，60℃氮气/空气吹干；
- 6) 用 1ml 样本复溶液溶解干燥的残留物，振荡混匀 30s。

不同样本按如下方法稀释：

A) 虾鱼：直接取 50μl 水相用于检测。

样本稀释倍数：2 检测下限：0.2ppb

B) 猪肉/肝、鸡肉/肝：取 50μl 水相加入 450μl 样本复溶液，振荡混合 30s；取 50μl 用于检测。

样本稀释倍数：20 检测下限：2ppb

5.3.2 饲料样本处理方法

- 1) 称取 2±0.05g 捣碎后的饲料样本，加入 8ml 乙腈，振荡 2min，15℃ 4000r/min 离心 10min；
- 2) 取 2ml 上清液，60℃氮气/空气吹干；
- 3) 加入 0.5ml 氯仿，振荡 20s，加入 2ml 1M NaOH，振荡 30s，4000r/min 离心 5min；
- 4) 取 1ml 上清液，加入 100μl 6M H₃PO₄，振荡 5s；

不同样本按如下方法稀释：

A) 配合料：取 50μl，加入 950μl 样本复溶液，振荡混匀 30s，取 50μl 用于检测。

样本稀释倍数：100 检测下限：10ppb

B) 浓缩料/预混料：取 25μl，加入 975μl 样本复溶液，振荡混匀 30s，取 50μl 用于检测。

样本稀释倍数：200 检测下限：20ppb

5.3.3 尿样样本处理方法

- 1) 取 2ml 尿液到离心管中，室温 4000r/min 离心 10min，直至清亮；
- 2) 移取 1ml 清亮尿液至离心管中，加入 1ml 1M NaOH 强烈振荡 5min；
- 3) 加入 100 μ l 6M H₃PO₄，振荡 30 s；
- 4) 再加入 8ml 氯仿进行萃取，振荡 5min。15°C4000r/min 离心 10min；
- 5) 去掉上层的水相，取下层有机相 4 ml，60°C氮气吹干；
- 6) 用 3ml 样本复溶液干燥的残留物，混合 30s；
- 7) 取 50 μ l 用于分析。

样本稀释倍数：6 检测下限：0.6ppb

6 酶联免疫试验步骤

将所需试剂从 4°C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°C。

实验开始前，用去离子水将 20 $\times$ 浓缩洗涤液按 20 倍稀释成工作洗涤液。

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：加标准品应用液或样本 50 μ l/孔到各自的微孔中，然后加抗体工作液 50 μ l/孔，轻轻振荡 5 秒混匀，37°C避光反应 30 分钟。

6.3 洗 涤：将孔内液体甩干，用工作洗涤液 250 μ l/孔充分洗涤 5 次，每次间隔 30 秒，最后用吸水纸拍干（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：加酶标记物 100 μ l/孔，37°C避光反应 30 分钟。

6.5 洗 涤：同上

6.6 显 色：加底物液 A 50 μ l/孔，再加底物液 B 50 μ l/孔，轻轻振荡 5 秒混匀，37°C避光显色 15 分钟。

6.7 终 止：加终止液 50 μ l/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 10 分钟内完成。

7 结果分析

7.1 百分吸光率的计算

标准液或样本的百分吸光率等于标准液或样本的百分吸光度值的平均值（双孔）除以第一个标准液（0ppb）的吸光度值，再乘以 100%，即

$$\text{百分吸光度值 (\%)} = \frac{A}{A_0} \times 100\%$$

A—标准溶液或样本溶液的平均吸光度值

A₀—0ppb 标准溶液的平均吸光度值

7.2 标准曲线的绘制与计算

以标准液百分吸光率为纵坐标，对应的标准液浓度（ppb）的对数为横坐标，绘制标准液的半对数曲线图。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。（欢迎来电索取）

8 注意事项

8.1 室温低于 25°C或试剂及样本没有回到室温（25°C）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（ $A_{450nm} < 0.5$ ）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。