

四环素类检测试剂盒使用说明书

(酶联免疫法)

1 原理及用途

本试剂盒采用间接竞争 ELISA 方法检测组织、蜂蜜、鸡蛋等样本中的四环素类药物 (Tetracyclines, TCs)，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，加入标准品或样品溶液，样本中的四环素类药物和酶标板上预包被偶联抗原竞争抗四环素类药物抗体，加入酶标记物后，用 TMB 底物显色，样本吸光度值与其所含四环素类药物含量成负相关，与标准曲线比较即可得出样本中四环素类药物的残留量。

2 技术指标

2.1 试剂盒灵敏度: 0.05ppb(ng/ml)

2.2 反应模式: 37°C, 30min~30min~15min

2.3 检测下限:

组织、肝脏、鸡蛋.....	0.3ppb
蜂蜜.....	2ppb
尿样.....	0.5ppb

2.4 交叉反应率:

四环素.....	100%
二甲胺四环素.....	125%
吡四环素.....	110%
金霉素.....	100%
脱甲基金霉素.....	35%
土霉素.....	58%
强力霉素.....	45%

2.5 样本回收率:

组织、肝脏、鸡蛋.....	85±20%
蜂蜜.....	75±20%
尿样.....	80±20%

3 试剂盒组成

酶标板.....	96 孔
标准品 (黑盖): 各 1ml	0ppb、0.5ppb、1.5ppb、4.5ppb、13.5ppb、40.5ppb
高标准品 (黑盖): 1ppm.....	1ml
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 20 μ l-200 μ l，100 μ l-1000 μ l、多道 300 μ l

4.3 试剂：三氯乙酸、甲醇

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 1：1%三氯乙酸溶液

称取 1g 三氯乙酸加去离子水 100ml 溶解。

配液 2：复溶液

将 5 \times 复溶液用去离子水 5 倍稀释，用于样本的复溶，复溶液在 4 $^{\circ}$ C 环境可保存一个月。

5.3 样本前处理步骤：

5.3.1 组织、肝脏、鸡蛋样本处理方法（不用过柱）

- 1) 用均质器均质组织、肝脏、鸡蛋样本；
- 2) 称取 2 \pm 0.05g 样本于 50ml 离心管中，加入 6ml 1%三氯乙酸溶液，振荡 2min，室温 4000r/min 以上，离心 10min；
- 3) 取出 1ml 上清液于另一试管中，加入 1ml 甲醇，振荡 1min，室温 4000r/min 以上，离心 10min；
- 4) 取 1ml 上清液在 50-60 $^{\circ}$ C 氮气或空气吹干，加入 1ml 复溶液溶解残留的干燥物；
- 5) 取 50 μ l 用于分析。

样本稀释倍数：6 检测下限：0.3ppb

5.3.2 蜂蜜样本处理方法

- 1) 准确称取 1 \pm 0.05g 蜂蜜样本于离心管中，加入 2ml 1%三氯乙酸，振荡 2min，室温 4000r/min 以上，离心 10min；
- 2) 取出 100 μ l 上清液于另一试管中，加入 1900 μ l 复溶液稀释，混合 30s；
- 3) 取 50 μ l 用于分析。

样本稀释倍数：40 检测下限：2ppb

5.3.3 尿样本的处理方法

- 1) 用复溶液将尿样 10 倍稀释（如果尿样浑浊一定要过滤或离心 10min，4000r/min，直至得到清亮尿样），暂不使用的样本应冷冻保存。
- 2) 取 50 μ l 稀释的尿样用于分析。

样本稀释倍数：10 检测下限：0.5ppb

6 酶联免疫试验步骤

将所需试剂从 4 $^{\circ}$ 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 $^{\circ}$ 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。

制备四环素标准应用液：将各浓度标准品分别用稀释好的复溶液 10 倍稀释成应用液，**现配现用。**

（如：分别取 50 μ l 各浓度标准品加 450 μ l 稀释好的复溶液，混合均匀，即成各浓度标准品的应用液。）

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 $^{\circ}$ 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 $^{\circ}$ 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 $^{\circ}$ 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 $^{\circ}$ C或试剂及样本没有回到室温 (25 $^{\circ}$ 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 $^{\circ}$ C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。