

孔雀石绿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，同时把隐性孔雀石绿氧化成孔雀石绿，可检测动物组织和水样中的孔雀石绿 (Malachite Green, MG) 总量。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，样本中的孔雀石绿和酶标板上预包被偶联抗原竞争抗孔雀石绿抗体，加入酶标记物后，用 TMB 底物显色，样本吸光度值与其所含孔雀石绿含量成负相关，与标准曲线比较即可得出样本中孔雀石绿的残留量。

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, 10min~30min~30min~15min**

2.3 检测下限:

鱼/虾等水产品0.5ppb
水样0.1ppb

2.4 交叉反应率:

显性孔雀石绿.....100%
结晶紫.....91%
隐性孔雀石绿 (氧化后)100%
隐性结晶紫 (氧化后)91%

2.5 样本回收率:

鱼/虾等水产品、水样.....90%±10%

3 试剂盒组成

3 试剂盒组成

酶标板.....96 孔
10×标准品(棕色盖): 各 0.5ml
0ppb、0.5ppb、1ppb、2ppb、4ppb、8ppb
标准品稀释液(蓝盖).....10ml
10×浓缩酶结合物.....1.6ml
10×浓缩抗体.....0.8ml
底物液 A(白盖).....7ml
底物液 B(黑盖).....7ml
终止液(黄盖).....7ml
10X 浓缩洗涤液(白盖).....50ml
样本稀释缓冲液(红盖)5ml
氧化剂(黑盖).....3ml
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)、恒温箱

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

4.3 试剂：乙腈、乙酸、二氯甲烷、无水硫酸钠、中性氧化铝、正己烷

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：样本提取液

首先将乙腈与二氯甲烷配成体积比为 2:1 混合液，然后向上述混合液中加入乙酸，使其终浓度约为 1%，按需配制。（例：100ml 乙腈+50ml 二氯甲烷+1.5ml 乙酸。）

5.3 样本前处理步骤：

5.3.1 低脂肪含量样品（罗非鱼、鲫鱼、鲢鱼、鳙鱼、草鱼、虾、鲤鱼等）

- 1) 鱼虾去皮取肉，用匀浆器均质样品；
- 2) 称取 2g 均质好的样品，放入 50ml 离心管中，加入 10ml 样本提取液(配液 1)，立即摇匀，加入 1g 无水硫酸钠，充分震荡 10min，4000r/min 离心 5 min；
- 3) 取 7ml 上清移至 50ml 离心管中，加入 20ul 氧化剂，震荡 2min，加入 7ml 正己烷，颠倒混匀 1min，4000r/min 离心 5min。
- 4) 取下层 5ml，50-60℃下氮气吹干。加入 300ul 乙腈，涡旋使残渣溶解（注意盖紧盖防止乙腈挥发掉）。
- 5) 测定时取上述乙腈溶解液 25ul，加 50ul 样本稀释缓冲液，175ul 蒸馏水，混合均匀，取 50ul 分析。

样本稀释倍数：3 检测下限：0.5ppb

5.3.2 高脂肪含量样品（鳊鱼、鲈鱼等）

- 1) 鱼虾去皮取肉，用匀浆器均质样品；
- 2) 称取 2g 均质好的样品，放入 50ml 离心管中，加入 10ml 样本提取液(配液 1)，立即摇匀，再加入 1g 中性氧化铝、1g 无水硫酸钠，充分震荡 5min，4000r/min 离心 5 min；
- 3) 取 7ml 上清移至 50ml 离心管中，加入 20ul 氧化剂，震荡 2min，加入 7ml 正己烷，颠倒混匀 1min，4000r/min 离心 5 min。
- 4) 弃去全部上层正己烷层（注：中间蛋白脂肪层需弃除），再加入 7ml 正己烷，颠倒混匀 1min，4000r/min 离心 5min；
- 5) 取下层 5ml，50-60℃下氮气吹干，加入 300ul 乙腈，涡旋使残渣溶解（注意盖紧盖防止乙腈挥发掉）。
- 6) 测定时取上述乙腈溶解液 25ul，加 50ul 样本稀释缓冲液，175ul 蒸馏水，混合均匀，加入 500ul 正己烷涡旋 2min，弃去全部上层正己烷，取下层 50ul 分析。

样本稀释倍数：3 检测下限：0.5ppb

5.3.2 水质样品

取水样 175ul，加入 50ul 样本稀释缓冲液，25ul 乙腈，取 50ul 分析。

样本稀释倍数：1.43 检测下限：0.1ppb

注：此方法所得到的结果为孔雀石绿；隐性孔雀石绿；结晶紫；隐性结晶紫的总量。

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℃。

实验开始前需：

配液 A：洗涤工作液

将 50ml 10×浓缩洗涤液用去离子水按 1:9 稀释成 500ml 工作洗涤液备用。

配液 B：活化剂工作液

将氧化剂按 1:99 体积进行稀释（现用现配，按需配制）

配液 C：抗体工作液

用配液 A（洗涤工作液）将 10×浓缩抗体 10 倍稀释（临时用时，按需配制）

配液 D：酶标记物

用配液 A（洗涤工作液）将 10×浓缩酶结合物 10 倍稀释（临时用时，按需配制）

制备孔雀石绿标准液：

标准品溶液（0ppb, 0.05ppb, 0.1ppb, 0.2ppb, 0.4ppb, 0.8ppb）

取 6 个 1.5ml 离心管，把标准品浓缩液用标准品稀释液稀释 10 倍（如：450ul 标准品稀释液加入 50ul 10×标准品浓缩液）

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 活化：加 120ul 活化剂工作液（配液 B）到微孔中，室温下反应 10min，倒掉拍干，加洗涤工作液（配液 A）250ul/孔，洗涤 5 次，每次间隔 30s，弃去孔中液体，在吸水纸上拍干（拍干后未被清除的气泡可用未使用过的吸头戳破）。

6.3 加样反应：加标准品或样本 50μl/孔到各自的微孔中，然后加抗体工作液 50μl/孔，轻轻振荡 5 秒混匀，37°C避光反应 30 分钟。

6.4 洗涤：将孔内液体甩干，用洗涤液工作液 250μl/孔充分洗涤 5 次，每次间隔 30 秒，最后用吸水纸拍干。

6.5 加酶反应：加酶标记物 100μl/孔，37°C避光反应 30 分钟。

6.6 洗涤：同上

6.7 显色：加底物液 A 50μl/孔，再加底物液 B 50μl/孔，轻轻振荡 5 秒混匀，37°C避光显色 15 分钟。

6.8 终止：每孔加入终止液 50μl，轻轻振荡混匀，终止反应。

6.9 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。