

呋喃妥因代谢物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 方法检测蜂蜜、鱼、虾、禽、肝脏等中的呋喃妥因代谢物 (AHD)，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，样本中的呋喃妥因代谢物和酶标板上预包被偶联抗原竞争抗呋喃妥因代谢物抗体，加入酶标记物后，用 TMB 底物显色，样本吸光度值与其所含呋喃妥因代谢物含量成负相关，与标准曲线比较即可得出样本中呋喃妥因代谢物的残留量。

2 技术指标

2.1 试剂盒灵敏度: 0.05ppb(ng/ml)

2.2 反应模式: 25°C, 45min~15min

2.3 检测下限:

组织、肝脏.....	0.1ppb
蜂蜜、牛奶、肠衣.....	0.1ppb
奶粉、蛋粉.....	0.1ppb
鱼/虾等水产品组织因有一定干扰，定量下限为	0.15ppb

2.4 交叉反应率:

呋喃妥因代谢物.....	100%
呋喃唑酮代谢物.....	<0.1%
呋喃西林代谢物.....	<0.1%
呋喃他酮代谢物.....	<0.1%

2.5 样本回收率:

组织、肝脏.....	85±25%
蜂蜜、牛奶、肠衣.....	80±20%
奶粉、蛋粉.....	85±25%

3 试剂盒组成

酶标板.....	96 孔
标准液: 各 1ml	
0ppb、0.05ppb、0.15ppb、0.45ppb、1.35ppb、4.05ppb	
高标准液 (红盖): 100ppb.....	1ml
衍生化试剂 (黑盖)	10ml
酶标记物 (红盖)	5.5ml
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
2X 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：乙酸乙酯、正己烷、氢氧化钠、浓 HCl、K₂HPO₄·3H₂O、亚硝基铁氰化钾（K₂Fe(CN)₅(NO)·2H₂O）、ZnSO₄·7H₂O

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 1：0.36M 亚硝基铁氰化钾溶液（牛奶、奶粉样本）

11.9g 亚硝基铁氰化钾加去离子水至 100ml 溶解。

配液 2：1.04M 硫酸锌溶液（牛奶、奶粉样本）

29.8g 硫酸锌加去离子水至 100ml 溶解。

配液 3：0.1M K₂HPO₄ 溶液

称 11.4g K₂HPO₄·3H₂O 加去离子水溶解定容至 500ml。

配液 4：1M HCL

8.6mL 浓 HCL 加去离子水定容至 100mL。

配液 5：1M NaOH 溶液

称取 4g NaOH，加去离子水定容至 100ml。

配液 6：复溶液

将 2×复溶液用去离子水 2 倍稀释，用于样本的复溶，复溶液在 4°C 环境可保存一个月。

5.3 样本前处理步骤：

5.3.1 牛奶样本处理方法

1) 取 5ml 样本于离心管中，加 250 μ l 亚硝基铁氰化钾溶液（配液 1）振荡混合 30 秒，加 250 μ l 硫酸锌溶液（配液 2）振荡混合 30 秒，15°C 4000 转/分离心 10 分钟；

2) 取上清 1.1ml，加 4ml 去离子水、0.5 ml 1M 盐酸溶液和 100 μ l 衍生化试剂，振荡 5 分钟；

3) 在 37°C 过夜孵育（约 16 小时）或 50°C（超过 50°C 时会影响分层效果）水浴孵育 3 小时；

4) 分别加入 5ml 0.1M K₂HPO₄ 溶液，0.4ml 1M NaOH 溶液和 5ml 的乙酸乙酯，振荡 5 分钟；

5) 室温下 4000 转/分，离心 10 分钟；

6) 取出 2.5ml 的上层液到另一个离心管中，50-60°C 氮气或空气吹干；

7) 用 1ml 正己烷溶解残留物，加入 1ml 复溶工作液充分振荡混合 30 秒；室温 4000 转/分，离心 10 分钟；

8) 去除上层正己烷，取 50 μ l 下层液用于分析。

样本稀释倍数为 2 检测下限：0.1ppb

5.3.2 奶粉、蛋粉样本处理方法

1) 称取 1±0.05g 均质样于离心管中，加入 4ml 去离子水、0.5 ml 1M 盐酸溶液和 100 μ l 衍生化试剂，振荡 5 分钟；

2) 在 37°C 过夜孵育（约 16 小时）或 50°C（超过 50°C 时会影响分层效果）水浴孵育 3 小时；

3) 加 250 μ l 亚硝基铁氰化钾溶液（配液 1）振荡混合 30 秒，加 250 μ l 硫酸锌溶液（配液 2）振荡混合 30 秒，15°C 4000 转/分离心 10 分钟；

4) 取全部上清到另一个离心管中，后续接“5.3.1 牛奶样本处理方法，4)”

5.3.3 蜂蜜、组织、肠衣、肝脏、鸡蛋样本处理方法

1) 称取 1±0.05g 均质样于离心管中，加入 4ml 去离子水、0.5 ml 1M 盐酸溶液和 100 μ l 衍生化试剂，振荡 5 分钟；

2) 后续接“5.3.1 牛奶样本处理方法, 3)”

5.3.4 熟食样本处理方法

1) 称取 $1 \pm 0.05\text{g}$ 均质样于 50ml 离心管中, 加入 4.5ml 甲醇和 0.5ml 去离子水, 振荡 2min, 室温 4000 转/分, 离心 5 分钟, 去除全部液体;

2) 加入 5ml 乙醚和 5ml 正己烷, 振荡 2min, 室温 4000 转/分, 离心 5 分钟, 去除全部液体;

3) 在沉淀中加入 4ml 去离子水、0.5 ml 1M 盐酸溶液和 100 μl 衍生化试剂, 振荡 5 分钟;

注: 熟食的添加回收试验请在此步加入高标准。

4) 后续接“5.3.1 牛奶样本处理方法, 3)”

6 酶联免疫试验步骤

将所需试剂从 4 $^{\circ}\text{C}$ 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 $^{\circ}\text{C}$ 。

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: 加标准品或样本 50 μl /孔到各自的微孔中, 然后加酶标记物 50 μl /孔, 再加入 50 μl /孔的抗体工作液, 用盖板膜封板, 轻轻振荡 5 秒混匀, 25 $^{\circ}\text{C}$ 反应 45 分钟。

6.3 洗涤: 小心揭开盖板膜, 将孔内液体甩干, 用工作洗涤液 250 μl /孔充分洗涤 5 次, 每次间隔 30 秒, 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 显色: 每孔加入底物液 A 50 μl , 再加底物液 B 50 μl , 轻轻振荡 5 秒混匀, 25 $^{\circ}\text{C}$ 避光显色 15 分钟。

6.5 终止: 每孔加入终止液 50 μl , 轻轻振荡混匀, 终止反应。

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