

甲硝唑检测试剂盒

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、蜂蜜等样本中的甲硝唑 (Metronidazole, **MNZ**), 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, 样本中的甲硝唑和酶标板上预包被偶联抗原竞争抗甲硝唑抗体, 加入酶标记物后, 用 TMB 底物显色, 样本吸光度值与其所含甲硝唑含量成负相关, 与标准曲线比较即可得出样本中甲硝唑的残留量。

2 技术指标

2.1 试剂盒灵敏度: **0.5ppb (ng/ml)**

2.2 反应模式: **25℃ 30min~30min~15min**

2.3 检测下限:

组 织 (鸡、鸭肉/肝脏、鱼、虾、等)	0.25ppb
蜂蜜	0.25ppb

2.4 交叉反应率:

与类似物的交叉反应率:

甲硝唑 (MNZ)	100%
二甲硝咪唑 DMZ	68%

2.5 样本回收率:

鱼/虾/禽/肝脏	90±10%
蜂蜜样本	90±10%

3 试剂盒组成

酶标板 1 块, 96 孔/板

标准液 6 瓶 (黑盖): 1ml/瓶

0 ppb、0.5ppb、1.5ppb、4.5ppb、13.5ppb、40.5ppb

高标准液 100 ppb1ml

抗体工作液 (蓝盖).....5.5ml

酶标记物 (红盖).....	11ml
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).....	40 ml
2X 浓缩复溶液 (黄盖).....	50 ml
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: NaOH、无水碳酸钠、碳酸氢钠、正己烷、乙酸乙酯

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: 0.1M 碳酸盐缓冲液

称取 4.66g 无水碳酸钠, 0.5g 碳酸氢钠去离子水 500ml 溶解, pH 10.6。

配液 2: 2M 氢氧化钠溶液

称取 40g 氢氧化钠, 加入去离子水 500ml 溶解。

配液 3: 洗涤液

将浓缩洗涤液 20 倍稀释 (1 份洗涤液加 19 份去离子水)。

配液 4: 复溶液

将 2×复溶液用去离子水 2 倍稀释 (1 份复溶液加 1 份去离子水), 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、鸭肉/肝脏、鱼、虾、等)、蜂蜜

1) 取 3g 样本, 加 3ml 0.1M 碳酸盐缓冲溶液振荡至蜂蜜全部溶解;

2) 加入 9ml 乙酸乙酯, 振荡 5 分钟, 室温 4000 转/分, 离心 5 分钟;

3) 取上层有机相 6ml 至另一离心管中, 加入 2ml 乙酸乙酯, 2ml 2M 氢氧化钠溶液, 振荡 5 分钟, 室温 4000 转/分, 离心 5 分钟;

4) 取 4ml 清澈上层有机相至干净玻璃试管中, 30~40℃ 氮气或空气吹干;

5) 加入正己烷 1ml, 涡动 30s, 再加入 0.5ml 复溶液混合 30 秒, 室温 4000 转/分以上, 离心 5 分钟;

6) 去除上层有机相, 取下层 50μl 液体用于分析。

稀释倍数 0.5 检测下限 0.25ppb

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℃。

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 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, 25℃ 避光反应 30 分钟。

6.3 **洗涤**: 将孔内液体甩干, 用工作洗涤液 250μl/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 100μl/孔, 25℃ 避光反应 30 分钟。

6.5 **洗涤**: 同上

6.6 **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, 25℃ 避光显色 15 分钟 (若蓝色过浅, 可适当延长反应时间)。

6.7 **终止**: 每孔加入终止液 50μl, 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℃或试剂及样本没有回到室温（25℃）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。

【生产企业】

企业名称：深圳芬德生物技术有限公司