

恩诺沙星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、动物组织（鸡肉、猪肉、鱼、虾）、牛奶、奶粉和鸡蛋等样本中的恩诺沙星（Enrofloxacin, ENR），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，样本中的恩诺沙星和酶标板上预包被偶联抗原竞争抗恩诺沙星抗体，加入酶标记物后，用 TMB 底物显色，样本吸光度值与其所含恩诺沙星含量成负相关，与标准曲线比较即可得出样本中恩诺沙星的残留量。

2 技术指标

2.1 试剂盒灵敏度：0.1ppb(ng/ml)

2.2 反应模式：25℃，45min~15min

2.3 检测下限：

组织（鸡肉、猪肉、鱼、虾）	0.3ppb
蜂蜜	0.4ppb
牛奶	3ppb
奶粉	6ppb
鸡蛋	3ppb

2.4 交叉反应率：

恩诺沙星	100%
噁啉酸	28%
左氧氟沙星	10%
洛美沙星	4%
麻保沙星	4%
沙拉沙星	2%

2.5 样本回收率：

组织、蜂蜜、牛奶、奶粉、鸡蛋	85%±15%
----------------	---------

3 试剂盒组成

酶标板	96 孔
标准液：各 1ml	
0ppb、0.1ppb、0.3 ppb、0.9ppb、2.7ppb、8.1ppb	
高标准液（红盖）：100ppb	1ml
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
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：无水乙腈、正己烷、浓 HCl

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 1：0.15M 盐酸溶液

取 5ml 浓盐酸，加入去离子水中定容到 400ml。

配液 2：样本提取液

量取 10ml 0.15M 盐酸溶液（配液 1）加入到 90ml 无水乙腈中混合均匀。

配液 3：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 动物组织（鸡肉、猪肉、鱼、虾）处理方法

- 1) 称 2.0 $\pm$ 0.05g 均质过的组织样本于 50ml 离心管中；
- 2) 加入 8ml 样本提取液（配液 2），振荡 5 分钟，室温 4000 转/分离心 10 分钟；
- 3) 取 2ml 清澈上层有机相至洁净干燥的 10ml 玻璃试管中，50-60 $^{\circ}$ C 水浴氮气吹干；
- 4) 加入 1ml 正己烷，振荡 2 分钟，再加 1ml 复溶液（配液 3），振荡 30 秒，室温 4000 转/分离心 5 分钟；
- 5) 去除上层正己烷，取下层水相 50 μ l 液体用于分析。

样本稀释倍数：2 检测下限：0.3ppb

5.3.2 蜂蜜处理方法

- 1) 取 1.0 $\pm$ 0.05g 蜂蜜至 50ml 聚苯乙烯离心管中，加 6ml 样本提取液（配液 2），振荡 5 分钟，使其充分溶解；
- 2) 加入 3ml 复溶液（配液 3），加入 11ml 二氯甲烷，振荡 5 分钟，室温 4000 转/分，离心 5 分钟；
- 3) 吸去上层，取下层有机相 8ml 至干燥容器中，50-60 $^{\circ}$ C 水浴氮气吹干；
- 4) 用 1ml 复溶工作液溶解干燥的残留物，再加入正己烷 1ml 混合 30 秒，室温 3000 转/分以上，离心 5 分钟；
- 5) 去除上层取下层 50 μ l 液体用于分析。

样本稀释倍数：2 检测下限：0.4ppb

5.3.3 牛奶处理方法：

- 1) 取 25 μ l 样本液与 475 μ l 复溶液（配液 3）混合，振荡 1 分钟，使其充分溶解；
- 2) 取 50 μ l 液体用于分析。

样本稀释倍数：20 检测下限：3ppb

5.3.4 奶粉处理方法：

- 1) 称取 0.5 $\pm$ 0.02g 均质物至 10ml 聚苯乙烯离心管中，加入 5ml 去离子水，振荡，使其充分溶解；
- 2) 取 100 μ l 样本液与 400 μ l 复溶液（配液 3）混合，振荡 1 分钟；
- 3) 取 50 μ l 液体用于分析。

样本稀释倍数：50 检测下限：6ppb

5.3.5 鸡蛋处理方法：

- 1) 称取 1.0 $\pm$ 0.02g 均质物至 10ml 聚苯乙烯离心管中，加入 5ml 去离子水，振荡，使其充分溶解；
- 2) 取 100 μ l 样本液与 400 μ l 复溶液（配液 3）混合，振荡 1 分钟；

3) 取 50 μ l 液体用于分析。

样本稀释倍数: 30 检测下限: 3ppb

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, 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 μ l/孔到各自的微孔中, 然后加酶标记物 50 μ l/孔, 再加入 50 μ l/孔的抗体工作液, 用盖板膜封板, 轻轻振荡 5 秒混匀, 25℃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 μ l/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 μ l, 再加底物液 B 50 μ l, 轻轻振荡 5 秒混匀, 25℃避光显色 15 分钟。

6.5 终止: 每孔加入终止液 50 μ l, 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℃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。

