仅供科研使用，不得用于临床检验。

替米考星检测试剂盒（ELISA）说明书

【产品名称】

通用名称： 替米考星检测试剂盒（ELISA）

【包装规格】

48 / 96 人份/盒

【预期用途】

仅供科研使用，定量检测组织、肝脏、蜂蜜、鸡蛋和牛奶中的替米考星的残留量。

【检验原理】

本试剂盒采用间接竞争 ELISA 方法，检测组织、肝脏、蜂蜜、鸡蛋和牛奶中的替米考星含量。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，样本中的替米考星和酶标板上预包被偶联抗原竞争抗替米考星抗体，再与酶标记物形成抗原抗体复合物，用 TMB 底物显色，样本吸光度值与其替米考星含量成负相关，与标准曲线比较乘以样本稀释倍数即可得出样本中替米考星的残留量。

【主要组成成分】

主要成分

组分	数量	主要成分
包被微孔板	48T / 96T	预包被固相抗体
标准品	1.0 mL×6 管	
高标准品	1.0 mL	
HRP 标记物	3mL/5.5mL	HRP 标记的检测抗体
抗体工作液	3mL/5.5mL	
底物液 A	6mL	过氧化脲工作液
底物液 B	6mL	TMB 工作液
终止液	6mL	--
20×浓缩洗涤液	40mL	含 0.15%Tween20 的 PBS
2×复溶液	50mL	
说明书	1 份	--
自封袋	1 个	--
不干胶	2 片	--

标准品浓度从高到低依次为：40.5ppb、13.5ppb、4.5ppb、1.5ppb、0.5ppb、0ppb

需要但未提供的材料及耗材

1、酶标仪

2、精密移液器及一次性吸头

3、蒸馏水

4、洗瓶或者自动洗板机

5、25℃水浴锅或恒温箱

6、500ml 量筒

7、无粉一次性乳胶手套

8、无水碳酸钠（分析纯）；碳酸氢钠（分析纯）； 甲醇（分析纯） ；乙酸乙酯（分析纯）；正已烷

【储存条件及有效期】

1、2-8℃保存，切勿冷冻，有效期 6 个月。

2、开封使用后，包被微孔板放入带有干燥剂的自封袋中，密闭自封袋，并将全部试剂放回2-8℃冰箱。

3、开封后，按照建议的条件保存，校准品、包被微孔板和 HRP 标记抗体，有效期为 14 天，其他成分在标签标明的有效期内是稳定的。

【适用仪器】

半自动的酶标仪，如 Thermo MK3，或者国产酶标仪。

【样本要求】

样本前处理

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。

2、配液

配液 1: 0.1M (PH=10.6) CB 缓冲液

称取 0.932g 无水碳酸钠和 0.1g 碳酸氢钠加入 100ml 去离子水溶解混匀。

配液 2: 0.5M (PH=10.6) CB 缓冲液

称取 4.66g 无水碳酸钠和 0.5g 碳酸氢钠加入 100ml 去离子水溶解混匀。

配液 3:复溶液

1 份 2× 复溶液 +1 份去离子水混匀，即可得到复溶液。

配液 4: 牛奶、鸡蛋稀释液

取复溶液与甲醇按 19:1 体积比混合，即（ 19 份复溶液 +1 份甲醇）。

配液 5: 洗涤工作液

将浓缩洗涤液 20 倍稀释(1 份洗涤液加 19 份去离子水)

3、样本前处理步骤：

1、高检测限样本前处理方法

动物组织（猪肉、 鸡肉、 牛肉、 羊肉、 鱼、 虾）

1、称取 2.0 ± 0.05g 均质后的组织样本至 50ml 聚苯乙烯

离心管中，分别加入 2ml 0.1M （ PH=10.6 ） CB(配液 1)

和 8ml 乙酸乙酯，用涡动仪涡动 3min ，3000r/min

室温离心 5min ；

2、取 4ml 上层有机相至 10ml 洁净干燥玻璃管中，于 50-60 ℃水浴氮气流下吹干；

3、 加入 1ml 正已烷，用涡旋仪涡动 30s ，再加入 1ml 复溶液， 用涡旋仪涡动 30s ， 3000 r/min 室温离心 5min ；

4、除去上层，取下层 50μl 用于分析。

样本稀释倍数：1　　检测下限：0.5ppb

2、低检测限样本前处理方法

动物组织（猪肉、 鸡肉、 牛肉、 羊肉、 鱼、 虾）

1、 称取 1.0 ± 0.05g 均质后的样本至 50ml 聚苯乙烯离心管中，加入 4ml 洗涤工作液（配液 5 ），用涡动仪涡动 3min ， 3000 r/min 室温离心 5min ；

2、 取 200μl 上层清液，再加入 600μl 复溶液，用涡旋仪涡动 30s ，混匀；

3、取 50μl 用于分析。

样本稀释倍数：20　　检测下限：10ppb

3、肝脏（鸡肝、鸭肝、猪肝）

1、称取 1.0 ± 0.05g 均质后的样本至 50ml 聚苯乙烯离心管中， 分别加入 2ml 0.5M （ PH=10.6 ） CB(配液 2) 和 8ml 乙酸乙酯，用涡动仪涡动 3min ，3000 r/min 室温离心 5min ；

2、取 2ml 上层有机相至 10ml 洁净干燥玻璃管中，于 50-60 ℃水浴氮气流下吹干；

3、加入 1ml 正已烷，用涡旋仪涡动 30s，再加入 1ml 复溶液，用涡旋仪涡动 30s，3000 r/min 室温离心 5min；

4、 除去上层，取 100μl 下层加 400μl 复溶液，用涡旋仪涡动 30s，混匀；

5、取 50μl 用于分析。

样本稀释倍数：20　　检测下限：10ppb

4、蜂蜜

1、称取 2.0 ± 0.05g 蜂蜜样本至 50ml 聚苯乙烯离心管中， 分别加入 2ml 0.1M （ PH=10.6 ） CB(配液 1)，和 8ml 乙酸乙酯，用涡动仪涡动 3min ， 3000g 室温离心 5min ；

2、取 2ml 上层有机相至 10ml 洁净干燥玻璃管中，于 50-60 ℃水浴氮气流下吹干；

3、加入 1ml 复溶液 ，用涡旋仪涡动 30s ，混匀；

4、取 50μl 用于分析。

样本稀释倍数：2　　检测下限：1ppb

5、鸡蛋

1、用均质器低速均质鸡蛋样本；

2、取 100μl 均质后的鸡蛋样本加 900μl 鸡蛋稀释液 （ 配液 4），用涡旋仪涡动 30s ，混匀；

3、取 50μl 用于分析。

样本稀释倍数：10　　检测下限：5ppb

6、牛奶

1、取 100μl 鲜牛奶样本；

2、加入 900μl 牛奶稀释液 （ 配液 4），用涡旋仪涡动 30s ，混匀；

3、取 50μl 用于分析。

样本稀释倍数：10　　检测下限：5ppb

【检验方法】

试剂准备

1、使用前，所有的组分都要至少复温 30min，确保充分复温到室温。

2、浓缩洗涤液：从冰箱取出的浓缩洗涤液，会有结晶产生，这属于正常现象，水浴加热使结晶完全溶解。浓缩洗涤液与蒸馏水，按 1:20 稀释，即 1 份的浓缩洗涤液，添加 19 份的蒸馏水。

操作程序

1、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。

2、加标准品或样本 50μl/孔到各自的微孔中，然后加酶标记物 50μl/孔，再加入 50μl/孔的抗体工作液，用盖板膜封板，轻轻振荡 5 秒混匀，25℃反应 30 分钟。

3、小心揭开盖板膜，甩去孔内液体，每孔加 350ul 工作洗涤液，静置 30 秒后弃去，重复洗涤 5 次，最后一次拍干（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）。

4、每孔加入底物液 A 50μl，再加底物液 B 50μl，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）。

5、每孔加入终止液 50μl，轻轻振荡混匀，终止反应。

6、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。

【检验结果的解释】

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

$$\text{百分吸光度值（%）} = \frac{A}{A0} \times 100\%$$

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

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。

【检验方法的局限性】

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。

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。

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。

4、在所有孵育过程中，用盖板膜封住微孔板，避免光线照射。

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。

6、显色液若有任何颜色表明变质，应当弃之。

7、反应终止液有腐蚀性，避免接触皮肤。

【产品性能指标】

1、物理性能

试剂盒的各液体组分应澄清透明、无沉淀或者絮状物。微孔板铝箔袋应真空包装，无破损漏气。

2、剂量反应曲线线性

校准品剂量反应曲线相关系数 r 值，大于等于 0.9900。

3、精密度

批内精密度：三组已知的高、中、低浓度样品，进行二十次在同一个板块内精度评估。

批内变异系数 CV%小于 10%。

批间精密度：三组已知的高、中、低浓度样品，进行二十次在不同板块内精度评估。

批间变异系数 CV%小于 15%。

4、试剂盒灵敏度：0.5ppb(ng/ml)

5、反应模式：25℃，30min～15min

6、检测下限：

动物组织（高检测限） ……0.5ppb

动物组织（低检测限） …… 10ppb

肝脏（鸡肝、 猪肝）…… 10ppb

蜂蜜…… 1ppb

鸡蛋、牛奶…… 5ppb

7、交叉反应率：

替米考星 ……100%

泰乐菌素…… 1%

8、样本回收率：

动物组织（高检测限）…… 90%±20%

动物组织（低检测限）…… 90%±20%

肝脏（鸡肝、鸭肝、猪肝）…… 75%±15%

蜂蜜…… 95%±25%

鸡蛋、牛奶…… 95%±25%

【注意事项】

生物安全

1、检测必须符合实验室管理规范的规定，严格防止交叉污染，所有样品、洗弃液和各种废弃物都应按照传染物进行处置。

2、试剂盒的液体组分中，含有 proclin-300 防腐剂，可能引起皮肤过敏反应，避免吸入烟雾与皮肤接触。

3、底物液对皮肤、眼睛和上呼吸道有刺激作用，避免吸入烟雾。戴上防护手套，实验完成后彻底洗手。

技术提示

1、混合蛋白溶液时，避免起泡。

2、加校准品与样本时，每个校准品浓度和样本都要更换移液枪头，公共组分应该悬臂加样，避免交叉污染。

3、合适的温育时间，和充分的洗涤步骤，是保证实验结果准确性的必要条件。

4、底物溶液为无色液体，保存过程中变为蓝色，代表底物溶液已经失效，不得使用。

5、终止液加样顺序与底物溶液加样顺序一致，加入终止液后，蓝色底物产物，会瞬间变为黄色。

6、实验中，用剩的板条，应立即放回自封袋中，密封（低温干燥）保存。

7、所有液体组分，使用前充分摇匀，严格按照说明书标明的时间、加样量及加样顺序进行温育操作。

废物处理

所有使用或未使用的试剂，所有污染性的一次性材料，应当遵循传染性或潜在传染性产品的处理程序，每个实验室都有责任根据其实验的类型和危险性级别，进行废物和污物的处理，同时要严格依照有关规定对待所有的废物和污物。