（仅供科研使用，不得用于临床诊断!）

环丙沙星检测试剂盒（ELISA）
使用说明书

规格：48T / 96T

检测范围：0.1→8.1ppb

交叉反应率：

环丙沙星：100%	洛美沙星：4%
噁喹酸：28%	麻保沙星：4%
左氧氟沙星：10%	沙拉沙星：2%

灵敏度：0.01ppb（ng/mL）

反应模式：25℃， 45min～15min

重复性：板内变异系数均<10%，板间变异系数均<15%。

保存、有效期：2-8℃保存 6 个月

用途：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环丙沙星。

实验原理

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环丙沙星（Ciprofloxacin，CPFX），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，样本中的环丙沙星和酶标板上预包被偶联抗原竞争抗环丙沙星抗体，加入酶标记物后，用 TMB 底物显色，样本吸光度值与其所含环丙沙星含量成负相关，与标准曲线比较即可得出样本中环丙沙星的残留量。

试剂盒限制性

1、供科研使用，不得用于临床诊断。

2、在试剂盒标示的有效期内使用，过期产品不得使用。

3、跟其他厂家的试剂盒或者组分不能混用。

4、使用试剂盒配套的样品稀释液。

5、如果样本值高于最高标准品浓度值，请将样本适当稀释后，再重新测定。

6、通过其他方法得到的检测结果，与本试剂盒测定结果不具有直接的可比性。

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、使用自动洗板机时，加入一个 30 秒浸泡的步骤，可以提高检测精度。

5、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。

6、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。

7、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。

8、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。

需要的器材和试剂

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）

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

3、试剂：无水乙腈、正己烷、浓 HCl

试剂盒组分与保存

未开封的试剂盒保存在 2-8 度，不得使用过期试剂盒。

组分	数量	开封后储存
校准品	1ml/6 管	2-8℃14 天
高标准液	1ml（100ppb）	2-8℃14 天
包被微孔板	48T / 96T/	2-8℃14 天
酶标记物	3mL/5.5mL	2-8℃180 天
抗体工作液	3mL/5.5mL	2-8℃180 天
底物液 A	6mL	2-8℃180 天
底物液 B	6mL	2-8℃180 天
终止液	6mL	2-8℃180 天
20×浓缩洗涤液	40mL	2-8℃180 天
5X复溶液	50mL	2-8℃180 天
说明书	1 份	--
自封袋	1 个	--
不干胶	2 片	--

标准品浓度依次为：0ppb、0.1ppb、0.3 ppb、0.9ppb、2.7ppb、8.1ppb

注意：

1：如果试剂盒的组份需要再次使用，请确保上一次使用之后没有被污染。

2：酶标板单次未使用完，要谨记密封放到2-8℃保存。

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。

3、避免与皮肤接触。

4、底物液对皮肤、眼睛和上呼吸道有刺激作用，避免吸入烟雾。

5、戴上防护手套，实验完成后彻底洗手。

样品的采集和储存

以下只是列出样品采集和保存的一般指南。所有样本采集保存过程中，不得使用叠氮钠做为防腐剂。

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×复溶液用去离子水 5 倍稀释，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 动物组织（鸡肉、猪肉、鱼、虾）处理方法

1）称 2.0±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℃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50μl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±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至干燥溶器中，50-60℃水浴氮气吹干；

4）用 1ml 复溶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50μl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 25μl 样本液与 475μl 复溶液（配液 3）混合，振荡 1 分钟，使其充分溶解；

2）取 50μl 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±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 100μl 样本液与 400μl 复溶液（配液 3）混合，振荡 1 分钟；

3）取 50μl 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±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 100μl 样本液与 400μl 复溶液（配液 3）混合，振荡 1 分钟；

3）取 50μl 液体用于分析。

样本稀释倍数：30　　检测下限：3ppb

操作程序

所有试剂和组分都先恢复到室温，标准品、质控品和样品，建议做复孔。

1、按前面说明书描述的方法，配制好试剂盒各种组分的工作液。

2、从铝箔袋中取出所需板条，剩余的板条用自封袋密封放回冰箱。

3、设置标准品孔和样本孔，标准品孔各加不同浓度的标准品 50 μL，样本孔加待测样本 50 μL。

4、加入酶标记物 50 μL，再加入抗体工作液 50 μL。

5、用封板膜盖住反应板，37℃水浴锅或恒温箱避光孵育 30min。

6、揭开封板膜，弃去液体，吸水纸上拍干，每孔加满洗涤液，静置 20S，甩去洗涤液，吸水纸上拍干，如此重复 5 次。若使用自动洗板机，请按洗板机操作程序进行洗板，添加浸泡 30s 的程序，可以提高检测的精度。洗板结束，加底物前，要在干净不掉屑的纸上，充分拍干反应板。

7、将底物 A 和 B 按 1:1 体积充分混合，所有孔中加入底物混合液 100 μL。用封板膜盖住反应板，37℃水浴锅或恒温箱避光孵育 15min。

8、所有孔加入终止液 50 μL，在酶标仪上读取各孔吸光度（OD 值）。

结果分析：

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

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

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

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，利用计算机软件，采用四参数 Logistic 曲线拟合（4-pl），创建标准曲线方程，通过样本的吸光度（OD 值），利用方程计算样品的浓度值，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）

试剂盒性能指标

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 CV 值小于 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 CV 值小于 15%。

4、检测下限

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

5、回收率

分别往不同样本中添加已知的高、中、低浓度目的蛋白样品，进行五次在同一个板块内回收率评估，回收率在 85%-115%之间。

组织（%）	蜂蜜（%）	牛奶（%）	奶粉（%）	鸡蛋（%）
85±15	85±15	85±15	85±15	85±15

[说明]

1、由于现有条件及科学技术水平尚不能对供货商提供的所有所有原料进行全面的鉴定与分析，本产品可能存在一定的质量技术风险。

2、最终的实验结果与试剂的有效性、实验者的相关操作以及实验环境密切相关，请务必准备充足的标本备份。

3、不同批次的同一产品可能会有少许差别，网站电子版说明书仅作参考。

4、本试剂盒配套试剂必须配套使用，不能混用其他制造商的产品。只有严格遵守本试剂盒的实验说明才会得到最佳的检测结果。

5、用于制备试剂盒中抗体的免疫原通常为重组蛋白，但由于备重组蛋白所选取的片段、表达系统、纯化方式等各有不同，所以我们无法保证该试剂盒可用于其他公司重组蛋白的检测，通常我们也不建议使用试剂盒检测重组蛋白。

6、该试剂盒仅供研究使用，如将其用于临床诊断或任何其他用途，我公司将不对因此产生的问题负责，亦不承担任何法律责任。

[警告]

本试剂盒中使用了稀硫酸作为终止液，其具有轻微腐蚀性，使用时应避免接触衣物或眼、手等皮肤暴露部位。

[问题解答]

问题	可能原因	解决方案
标准曲线差	试剂盒平衡时间不够	不低于 2 个小时的室温平衡
	吸取及洗涤不充分	充分的吸取及洗涤
	移液不精确	检查和校正移液器
精密度低	洗涤不充分	按说明书要求充分洗涤和浸泡
	混匀不充分和吸取试剂不足	充分混匀和吸取试剂
	重复利用吸头、容器和覆膜	使用加样器要更换新的吸头、使用新的封板模
	加样不精确	检查和校正移液器
O.D 值低	每孔加的试剂量不精确	校正移液器，精确加入试剂
	温育时间不正确	保证充足的温育时间
	温育温度不正确	试剂要平衡至室温并保证准确的温育温度
	酶标记物或底物失效	通过混合酶标记物和底物，颜色迅速显现来检查
	没有加入终止液	按照说明书实验操作步骤加入终止液
	超出读数时间读数	在说明书推荐的读数时间内读数
样本值	不正确的样本储存方式	正确储存样本，使用新鲜样本进行实验
	不正确的样本收集和处理方法	采取正确的样本收集和处理方法
	待测物质在样本中含量低	使用新鲜样本，重复实验