仅供科研使用，不得用于临床检验。

呋喃妥因代谢物（AHD）检测试剂盒（ELISA）说明书

【产品名称】

通用名称：呋喃妥因代谢物（AHD）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，定量检测蜂蜜、鱼、虾、禽、肝脏等中的呋喃妥因代谢物（AHD）的残留量。

【检验原理】

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。

【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	
衍生化试剂	10mL	
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：1.62ppb、0.54ppb、0.18ppb、0.06ppb、0.02ppb、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、乙酸乙酯、正己烷、氢氧化钠、浓 HCl、$K_2HPO_4 \cdot 3H_2O$、亚硝基铁氰化钠（$Na_2Fe(CN)_5(NO) \cdot 2H_2O$）、硫酸锌 $ZnSO_4 \cdot 7H_2O$、乙腈、甲醇

【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 1：0.36M 亚硝基铁氰化钠溶液（牛奶、奶粉样本）

10.7g 亚硝基铁氰化钠加去离子水混匀溶解，定容至 100ml。

配液 2：1.04M 硫酸锌溶液（牛奶、奶粉样本）

29.8g 硫酸锌加去离子水混匀溶解，定容至 100ml。

配液 3：0.1M K_2HPO_4 溶液

称 11.4g $K_2HPO_4 \cdot 3H_2O$ 加去离子水混匀溶解，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，加去离子水混匀溶解，定容至 100ml。

配液 6：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。

配液 7:工作洗涤液

将浓缩洗涤液 20 倍稀释(1 份洗涤液加 19 份去离子水)。

3、样本前处理步骤：

1、牛奶样本处理方法

1)取 5ml 样本于离心管中，加 250ul 亚硝基铁氰化钠溶液(配液 1)振荡混合 30 秒，加 250ul 硫酸锌溶液（配液 2）振荡混合 30 秒，15℃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 100μl 衍生化试剂，振荡 5 分钟；

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

4）分别加入 5ml 0.1M K_2HPO_4 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℃氮气或空气吹干；

7）用 1ml 正已烷溶解残留物，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）去除上层正已烷，取 50μl 下层液用于分析。

样本稀释倍数为 2　　检测下限：0.04ppb

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 100μl 衍生化试剂，振荡 5 分钟；

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

3）加 250ul 亚硝基铁氰化钠溶液（配液 1）振荡混合 30 秒，加 250ul 硫酸锌溶液（配液 2）振荡混合 30 秒，15℃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)**”

样本稀释倍数为 2　　检测下限：0.04ppb

3、蜂蜜、组织、肠衣、肝脏、饲料、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 100μl 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)**”

样本稀释倍数为 2　　检测下限：0.04ppb

4、熟食样本处理方法

1）称取 1±0.05g 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 乙腈和 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 100μl 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)”

样本稀释倍数为 2　　检测下限：0.04ppb

【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 45 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：0.02ppb(ng/ml)

5、反应模式：25℃，45min～15min

6、检测下限

组织、肝脏、鸡蛋……0.04ppb

蜂蜜、牛奶、肠衣……0.04ppb

奶粉、饲料、蛋粉……0.04ppb

熟食……0.04ppb

7、 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%

呋喃它酮代谢物……<0.1%

8、样本回收率：

组织、肝脏、鸡蛋……85±25%

蜂蜜、牛奶、肠衣……80±20%

奶粉、饲料、蛋粉……85±25%

熟食……80±20%

【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。