

氯霉素 ELISA 试剂盒

货号: PMK1705

保存: 2-8℃避光保存 12 个月

规格: 48T/96T

检测范围: 0.05-4.05ppb 灵敏度: 0.025ppb

产品简介

氯霉素是一种广谱抗生素，具有很好的抗菌效果，常用于畜牧业生产中，然而，氯霉素会造成人的再生障碍性贫血，而且诱发浓度还没有确定，所以目前已经禁止在动物及食品中使用氯霉素。氯霉素快速检测试剂盒具有方便、快速、灵敏等特点，适用于大批量样品快速检测。

检测原理

本试剂盒采用间接竞争酶联免疫吸附法原理，在微孔条上预包被偶联抗原，待测抗原（标准品或样本）中的氯霉素和微孔条上预包被的偶联抗原竞争抗氯霉素抗体，加入酶标记物反应后，洗涤去除未结合的物质，然后用 TMB 底物显色，酶促反应产生蓝色物质，加入终止液后，变成黄色。在 450nm 波长下测定吸光值，样本吸光值与其所含残留物氯霉素的含量成负相关。最后通过建立标准曲线，将样本吸光值与标准曲线比较可得出相应残留物氯霉素的含量。

精密度: 板内变异系数<5%，板间变异系数<8%

样本定量检测下限:

肠衣: 0.1ppb

蜂蜜: 0.1ppb

牛 奶: 0.05ppb

尿液、血清: 0.1ppb

组织、肝脏: 0.025ppb

饲 料: 0.15ppb

样本回收率:

组织、肝脏: 80%±10%

蜂蜜、肠衣: 70%±10%

牛奶、饲料: 85%±15%

尿液、血清: 70%±10%

特异性: 检测具有高灵敏度和优良的特异性。与甲砒霉素、氟甲砒霉素没有显著交叉反应。

包装清单

试剂盒组分	规格		储存条件
	48T	96T	
预包被微孔板	48 孔	96 孔	2-8℃
标准品 (0ppb、0.05ppb、0.15ppb、0.45ppb、1.35ppb、4.05ppb)	0.5mL×6	1mL×6	2-8℃
酶标记物	3.5mL	7mL	2-8℃
抗体工作液	3.5mL	7mL	2-8℃

产品说明书

底物液 A	3.5mL	7mL	2-8℃避光保存
底物液 B	3.5mL	7mL	2-8℃避光保存
终止液	3.5mL	7mL	2-8℃
洗涤液 (20×)	20mL	40mL	2-8℃
浓缩复溶液 (2×)	25mL	50mL	2-8℃
封板膜	1 张	2 张	室温
说明书	1 份	1 份	室温

自备仪器、试剂

仪器：酶标仪（能测 450nm 处的吸光度）、氮气吹干装置、均质器、振荡器、离心机、刻度移液管、天平（感量 0.01g）、多通道移液器或自动洗板机、可调节式移液枪及枪头

试剂：乙酸乙酯、乙腈、正己烷、去离子水、亚硝基铁氰化钠、硫酸锌、葡萄糖苷酸酶(Merck, Art. No. 4114)、醋酸钠、醋酸

试剂准备

注意：各组分（小管试剂）开盖前，请先低速离心。

1. 使用前将所有试剂平衡至室温(18-25℃)。按照酶标仪说明书进行设置检测波长为 450nm，并在读板前预热 15 分钟。
2. 洗涤液：取浓缩洗涤液，根据检测数量，用去离子水或蒸馏水 1：20 稀释，混匀后备用。
3. 复溶液：将 2×浓缩复溶液用去离子水按 1：1 稀释。（1 份浓缩复溶液+1 份去离子水，用于抗体的稀释和样本提取后的复溶）。
4. 乙腈-水溶液： $V_{\text{乙腈}}:V_{\text{H}_2\text{O}}=84:16$
5. pH4.8 100mM 醋酸钠缓冲液（尿样本使用）：称 2.4g 醋酸钠和 1.2ml 醋酸加去离子水 500ml 溶解混合。
6. C 液（牛奶样本使用）：0.36M 亚硝基铁氰化钠 ($\text{Na}_2\text{Fe}(\text{CN})_5 \cdot \text{NO} \cdot 2\text{H}_2\text{O}$) 10.7g 亚硝基铁氰化钠加去离子水 100ml 溶解。
7. D 液（牛奶样本使用）：1M 硫酸锌 ($\text{ZnSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$) 28.8g 硫酸锌加去离子水 100ml 溶解。

样本前处理

（a）组织、肝脏样本前处理方法

- 1、用均质器均质组织样本；
- 2、称 $3 \pm 0.05\text{g}$ 样本于离心管中，先加入 3ml 去离子水充分混匀再加入 6ml 乙酸乙酯，振荡 5min，室温 4000r/min 以上，离心 10min；
- 3、取出 4ml 上层液体在氮气流 50-60℃水浴中干燥；
- 4、加入 1ml 正己烷溶解干燥的残留物，再加 1ml 稀释后的复溶液强烈振荡混合 30s，室温 4000r/min 以上离心 5min。
- 5、取 50 μl 下层相用于分析。
样本稀释倍数：0.5

（b）血清血浆

- 1、取 1ml 血清或血浆至试管中，加 2ml 乙酸乙酯振荡 1min；
- 2、静置使水相与有机相分层或室温 4000r/min 离心 5min；
- 3、移取上层的乙酸乙酯至另一试管中，用氮气流 50℃水浴中干燥；
- 4、残留物用 1ml 稀释后的复溶液溶解，混合 30s；
- 5、取 50 μl 用于分析。
样本稀释倍数：1

（c）尿液

- 1、移取 2ml 尿液到离心管中，加 pH4.8 100mM 醋酸钠缓冲液 0.5ml 混合；
- 2、加 40 μl 葡萄糖苷酸酶(Merck, Art. No. 4114)到稀释的尿液中，在 37℃水解至少 2 小时（或过夜）；

产品说明书

- 3、该溶液恢复至室温后加入 8ml 乙酸乙酯混合 1min;
- 4、室温 4000r/min 离心 10min, 取出 4ml 上层液体在氮气下 50~60℃干燥;
- 5、用 1ml 稀释后的复溶液溶解干燥的残留物, 混合 30s;
- 6、取 50μl 用于分析。

样本稀释倍数: 1

(d) 蜂蜜

- 1、取 2±0.05 g 蜂蜜, 放入离心管中, 用 4ml 去离子水溶解;
- 2、加入 4ml 乙酸乙酯上下振荡 5min;
- 3、室温 4000r/min 以上离心 10min;
- 4、移取 2ml 上层清液到另一离心管中, 50-60℃氮气流下干燥;
- 5、用 0.5ml 稀释后的复溶液溶解, 混合 30s;
- 6、取 50μl 用于分析。

样本稀释倍数: 0.5 检测下限: 0.025ppb

定量下限: 0.1ppb

注: 我们推荐 0.1ppb 为阳性样本的 cut off 值。

(e) 肠衣

- 1、用均质器均质样本注: 干样本需剪碎(长度不超 5mm)后再均质, 湿样本需用去离子水漂洗 20min 以上(去除表面的盐份), 沥干后再进行均质。
- 2、称 1±0.05g 均质后的样本于离心管中, 加入 10ml 乙酸乙酯, 振荡 5min, 室温 4000r/min 以上, 离心 10min。
- 3、取出 5ml 上层液体(相当于 0.5g 的样本)在氮气流下 50-60℃干燥。
- 4、加入 1ml 正己烷溶解干燥的残留物, 再加 0.5ml 稀释后的复溶液强烈振荡混合 30s, 室温 4000r/min 以上, 离心 5min。
- 5、去上层相, 取下层 50 μl 用于分析。

样本稀释倍数: 1

(f) 牛奶和奶粉

牛奶样本处理方法一

- 1、牛奶样本, 10℃4000r/min 以上离心 10min, 吸除上层脂肪;
- 2、取 5ml 去除脂肪奶样至离心管中, 加入 150μl C 液出现沉淀, 短暂振荡后加入 150μl D 液混合;
- 3、15℃4000r/min 以上, 离心 10min, 移取上层液;
- 4、用稀释后的复溶液以等体积稀释上层液, 混合 30s;
- 5、取 50μl 用于分析。

注: 如果离心后仍然浑浊, 再重复沉淀过程。

样本稀释倍数: 2 检测下限: 0.1ppb

定量下限: 0.15ppb

牛奶样本处理方法二

- 1、取 5ml 去除脂肪奶样至离心管中;
- 2、加入 250μl C 液和 250μl D 液彻底混合, 4-12℃4000r/min 以上离心 10min。如果没有冷冻离心机, 请预先将样本冷却到 8℃;
- 3、转移出 2.2ml 上层液(相当于 2ml 奶样)至一个新的离心管中, 加入 4ml 乙酸乙酯上下振荡 5min;
- 4、室温(20-25℃)4000r/min 以上离心 10min ;
- 5、转移出 2ml 乙酸乙酯上层液体(相当于 1ml 奶样), 60℃氮气流下完全干燥;
- 6、用 0.5ml 稀释后的复溶液溶解干燥的残留物, 混合 30s;
- 7、取 50μl 用于分析。

样本稀释倍数: 0.5 检测下限: 0.025ppb

定量检测限: 0.05ppb

由于阴性样本可能会产生背景干扰(在某些情况下干扰数值在标准 2 到 3 之间), 所以推荐标准 3 作为阳性结果的 CUT OFF 判断值。

奶粉样本处理方法

- 1、称 2±0.05 g 奶粉至离心管中, 加入 10ml 去离子水, 振荡溶解;
- 2、加 1ml C 液和 1ml D 液彻底混合。4-12℃4000r/min 以上离心 10min。若无冷冻离心机, 请预先将样本冷

产品说明书

却到 8℃;

- 3、 转移出 3.6ml 上层液 (相当于 0.6g 奶粉) 至一个新的离心管中, 加入 6ml 乙酸乙酯上下来回振荡 5min;
- 4、 室温 (20-25℃) 4000r/min 以上离心 10min;
- 5、 转移出 4ml 乙酸乙酯上层液体 (相当于 0.4g 奶粉), 60℃ 氮气流下完全干燥;
- 6、 用 0.4ml 稀释后的复溶液溶解干燥的残留物, 混合 30s;
- 7、 取 50 μ l 用于分析。

样本稀释倍数: 1 检测下限: 0.05ppb

定量检测限: 0.15ppb

由于阴性样本可能会产生背景干扰 (在某些情况下干扰数值在标准 2 到 3 之间), 所以推荐标准 3 作为阳性结果的 CUT OFF 判断值。

(g) 蛋类

- 1、 用均质器低速均质样本 (蛋黄或全蛋);
- 2、 称取 3 ± 0.05 g 均质过的样本, 与 9mL 乙腈-水溶液 (84:16; $V_{\text{乙腈}}:V_{\text{水}}$) 振荡 5min, 15℃ 4000r/min 以上离心 10min;
- 3、 取 3ml 上层与 3ml 蒸馏水混合, 加入 4.5ml 乙酸乙酯混合 5min, 15℃ 4000r/min 以上离心 10min;
- 4、 将上层有机相转移到试管中 50℃ 下氮气吹干;
- 5、 加入 1ml 正己烷溶解残留物后, 用 2ml 稀释后的复溶液混合 30s, 离心去除正己烷。
- 6、 取 50 μ l 用于分析。

样本稀释倍数: 2 检测下限: 0.1ppb

定量检测限: 0.3ppb

(h) 饲料

- 1、 称取 2 ± 0.05 g 均质过的饲料样本, 加入 2ml 去离子水, 再加入 6ml 乙酸乙酯, 充分振荡 2min, 15℃ 4000r/min 以上离心 10min;
- 2、 取 2ml 上层有机相到试管中 56℃ 下氮气吹干;
- 3、 加入 1ml 正己烷溶解残留物, 用 1ml 稀释后的复溶液混合 30s, 离心去除上层正己烷。
- 4、 取 50 μ l 用于分析。

样本稀释倍数: 3 检测下限: 0.15ppb

实验步骤

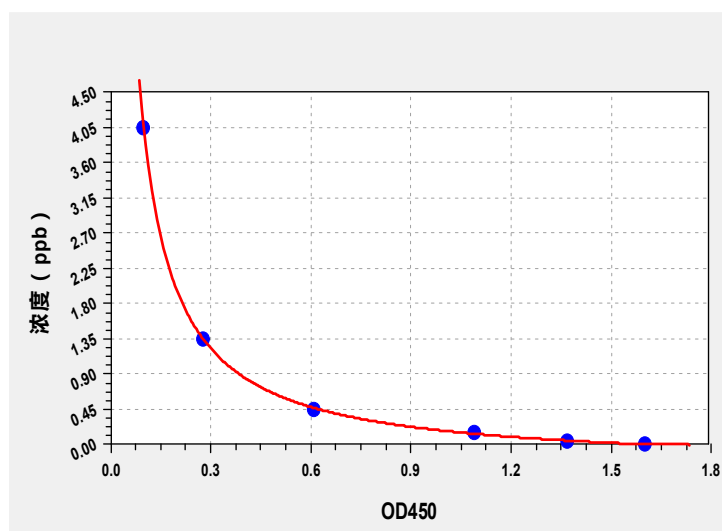
1. 从板框上取下多余的板条, 将它们放回装有干燥剂包的铝箔袋中, 然后重新密封。
2. 每孔加入 50 μ L 标准品或样品, 建议所有标准品和样品做复孔并记录标准孔和样本孔所在的位置。接着加入酶标记物 50 μ l/孔, 然后加入抗体 50 μ l/孔, 充分混匀, 给酶标板覆膜, 25℃ 环境中反应 30min。
3. 手工洗板: 弃去每孔中的液体, 每孔加入 350 μ L 洗涤液。浸泡 30 秒再倒出每孔中液体并在干净的吸水纸上拍干。重复这个洗涤步骤, 共 5 遍。洗板机洗板: 选择洗涤 5 次程序洗板后拍干。(拍干后未被清除的气泡可用干净的枪头刺破)。
4. 显色: 每孔加入底物液 A 50 μ l, 再加底物液 B 50 μ l, 振荡混匀后, 25℃ 环境中避光显色 15min, 远离气流和其他温度波动。
5. 测定: 每孔加入 50 μ L 终止液, 终止液应按照与底物液相同的顺序加到板中。孔中的颜色应从蓝色变为黄色。如果孔中的颜色为绿色或颜色变化不均匀, 请轻轻敲击板以确保彻底混合。5min 内测定每孔 450nm 处的吸光值。

结果计算

以 x 轴为 OD 值, y 轴为标准品浓度拟合一条标准曲线, 通过回归分析确定回归方程。将样本 OD 值作为 x 带入方程计算 y 值 (浓度)。

结果展示

典型标准曲线 ($R^2 \geq 0.99$)



氯霉素标准曲线。数据和曲线仅供参考，实验者需根据自己的实验建立标准曲线

注意事项

1. 实验过程中请穿戴实验服、口罩和乳胶手套。请按照生物实验室的国家安全规定进行实验，尤其是在检测血样或其他体液时。终止液有一定的腐蚀性，操作时请做好防护措施。
2. 本试剂盒仅用于实验室科学研究，如果本试剂盒用于临床诊断或任何其他用途，我们将不对任何后果负责。
3. 本试剂盒应在有效期内使用，并请严格按照说明书进行存储。
4. 本试剂盒最佳反应温度为 25℃，温度过高或过低将导致检测吸光度值和灵敏度发生变化。
5. 新打开的 ELISA 酶标板可能含有水雾样物质，此为正常现象，不会对实验结果产生任何影响。未用完的板条应立即放回装有干燥剂的铝箔袋中，重新密封存储。
6. 不同批次号、不同厂家之间的组分不要混用；否则，可能导致结果异常。
7. 勤换吸头，避免各组分之间的交叉污染。实验之前须检查各种实验器具是否干净，必要时可对实验器具进行清洁，以避免污染，干扰实验结果。
8. 为了得到准确的实验结果，在孵育过程中，必须确保封板膜将酶标板密封。
9. 在使用自动洗板机时，添加清洗缓冲液后，在清洗步骤之间添加 30 秒的浸泡时间可提高分析精度。在洗板过程中如果出现板孔干燥的情况，则会伴随着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。
10. 标准物质和无色的底物液对光敏感，因此要避免直接暴露在光线下。底物液保存过程中应为无色，若有任何颜色表明变质，应当弃之。0 浓度标准的吸光度值小于 0.5 ($A_{450nm} < 0.5$) 时，表示试剂可能变质。

疑难解答

问题	可能原因	解决措施
标曲线性不好	标准品稀释不正确	确保标准品按照推荐方法溶解和稀释
	移液不准确	定期校准移液器并检查枪头密封性
	反应液蒸发	用封板膜密封酶标板
	洗板不彻底	足够的洗涤次数和加入足量洗涤液
	孔底有异物	读数前清洁板底
显色弱或无	试剂反应不充分	确保孵育时间并按推荐温度孵育
	试剂体积添加不足	检查移液器并严格按照操作步骤操作
	稀释不正确	检查试剂稀释步骤
	酶结合物失活	混合酶结合物和底物，通过显色反应检查
OD 值低	酶标仪设置不正确	检查仪器波长
	没加终止液	加入适量终止液
	读板时等待时间太长	及时读板

产品说明书

相关产品：

PMK1738 卡那霉素 ELISA 试剂盒

PMK1742 红霉素 ELISA 试剂盒

PMK1748 庆大霉素 ELISA 试剂盒

更多产品详情了解，请关注公众号：

