



肉类及饲料中氯霉素快速检测 ELISA 试剂盒

使用说明书（中文版）

产品编号：AAF-21121

【概述】

氯霉素（Chloramphenicol）是一种常用的广谱抗生素，通过抑制细菌蛋白质合成而发挥作用，曾被用来治疗人及动物的多种感染性疾病。但氯霉素存在严重的毒副作用，主要是抑制骨髓造血功能，引起粒细胞及血小板减少症，以及再生障碍性贫血。另外，氯霉素残留会引起细菌抗药性。目前氯霉素已被很多国家禁止使用，要求动物源性食品中氯霉素的残留限量为不得检出。但是，由于氯霉素价廉易得，因此仍然存在非法使用现象。

本试剂盒是应用酶联免疫法 ELISA 技术研发的新一代药物残留检测产品，与其它仪器分析方法相比不仅具有简单、灵敏、准确等特点，而且和其它方法相比具有同等检出限和更灵敏的线性范围，能最大限度地减少操作误差和工作强度，为大多厂家和质检部门所使用。

【用途】

本试剂盒用于定量、定性检测肉类(包括鱼虾类)，动物饲料样品中的氯霉素含量。试剂盒检测反应灵敏度为 0.05 $\mu\text{g/kg}$ (0.05 ppb)。

【检测原理】

本试剂盒是利用免疫分析直接竞争法的原理，在微孔板上预包被抗氯霉素抗体。检测时，加入氯霉素标准品或待测样品溶液及辣根过氧化物酶（HRP）标记的氯霉素（标记物），标记物将和标准品或样品中的氯霉素竞争性地与抗体结合。洗涤后用酶底物（TMB）系统显色，样本吸光值与其中所含氯霉素量成负相关，与标准曲线比较后即可得出样品中的氯霉素准确含量。

【试剂盒组成成份】

每一试剂盒中的试剂足够进行 96 个测量（包括标准分析孔）。盒中的材料如下：

- | | |
|--|------------|
| 1. 抗氯霉素抗体包被微孔板（可分为 12 条使用） | 8 孔×12 条 |
| 2. 氯霉素标准品 6 瓶，为标准溶液： | 每瓶 0.5 ml |
| A. 0 ng/mL; B. 0.05ng/mL; C. 0.15 ng/mL; D. 0.45 ng/mL; E. 1.35 ng/mL; F. 4.05 ng/ml | |
| 3. 样品稀释液（5×） | 10 mL×1 瓶 |
| 4. HRP 标记氯霉素（100×） | 0.1 mL×1 瓶 |
| 5. 分析缓冲液 | 10 mL×1 瓶 |
| 6. 微孔板洗涤液（20×） | 40 mL×1 瓶 |
| 7. 显色液（1×） | 11 mL×1 瓶 |



8. 终止液 (1×)	11 mL×1 瓶
9. 封板膜	1 张
10. 自封塑料袋	1 个

【使用单位所需仪器】

1. 96 微孔板酶标仪, 检测波长 450nm, 参考波长 630nm。
2. 20 μL—200 μL 微量加样器; 300 μL 多道加样器。

【检测步骤】

- * 使用前将试剂盒置于室温 (20—25℃) 平衡 30 min 以上, 注意每种液体试剂使用前均须摇匀。
- * 取出需要数量的酶标板微孔条插入框架中, 将不用的微孔条放入自封袋, 保存于 2—8℃ 不要冷冻。
- * 编号: 将样品和标准品对应微孔按序编号, 每个样品和标准品均需做二复孔。

样品处理方法:

肉类(包括鱼虾类)样品需在 ELISA 测定前按照如下步骤进行制备:

1. 将样品匀浆
2. 称取 1 克匀浆样品
3. 加入 2 mL 乙酸乙酯, 充分混匀
4. 在室温下,以每分钟 4000 转离心 10 分钟
5. 吸取 1 mL 上清液, 在氮气下吹干
6. 重溶于 0.5 mL 正己烷,再加入 0.5 mL 样品稀释液
7. 充分混匀后, 在室温下,以每分钟 4000 转离心 10 分钟
8. 弃去上清液,取 50 μL 下部水相溶液进行 ELISA 分析

ELISA 分析方法:

1. 配制洗涤缓冲液: 1 份洗涤缓冲液浓缩液,加 19 份蒸馏水配制成洗涤缓冲液
2. 配制酶标记物溶液:1 份酶标记物浓缩液,加 99 份蒸馏水,配制成酶标记物溶液
3. 加样: 用加样器每孔加标准品或样本 50 μL。
4. 加酶标记物: 用加样器每孔加 HRP 标记氯霉素 50 μL。
5. 温育: 轻轻振荡混匀一分钟, 用盖板膜封板后在室温 (20—25℃) 反应 30 分钟。
6. 洗板: 每孔加入微孔板洗涤液 200 μL, 倒掉后重复, 共清洗 4 次, 最后拍干。
7. 显色: 每孔加入显色液 100 μL, 轻轻振荡混匀, 室温 (20—25℃) 避光显色 10 分钟。
8. 测定: 每孔加入终止液 100 μL, 轻轻振荡混匀, 设定酶标仪于 450nm 处, 测定每孔吸光度值 (OD₄₅₀ 值)。

【结果判定】

结果判定有两种方法, 粗略判定可用第 1 种方法, 定量判定用第 2 种方法。注意样本吸光值与其所含氯霉素成负相关。

1. 定性检测

用样品的平均吸光度值与标准值比较即可得出其浓度范围 (ng/mL 或 ppb)。假设样品 1 的吸光度值为 0.6, 样品 2 的吸光度值为 1.2, 标准液吸光度值分别是: 0 ng/mL 为 2.300; 0.05 ng/mL 为 2.000; 0.15 ng/mL



为 1.650; 0.45 ng/mL 为 0.950; 1.35 ng/mL 为 0.400; 4.05 ng/mL 为 0.165。则样品 1 的浓度范围是 0.45-1.35 ng/mL; 样品 2 的浓度范围是 0.15-0.45 ng/mL。

2. 定量测定

a) 计算 B/B_0

所获得的每个浓度标准溶液和样本吸光度值的平均值 (B) 除以第一个标准品 A (零标准品) 的吸光度值 (B_0) 再乘以 100%, 即百分吸光度值。

百分吸光度值 (%) = $B/B_0 \times 100\%$

B — 标准溶液或样本溶液的平均吸光度值

B_0 — 0 ng/mL 标准溶液的平均吸光度值

b) 绘制标准曲线, 计算样本中氯霉素浓度

以氯霉素标准品浓度为 X 轴, 对应的百分吸光度值为 Y 轴, 在半对数坐标纸上绘制标准曲线图。相对应每一个样品的浓度可以从标准曲线上读出。也可以用回归方程法, 计算出样本溶液浓度。利用计算机专业软件, 更便于大量样品的快速分析。

【注意事项】

1. 保存试剂盒于 2—8℃, 不要冷冻; 将不用的微孔板放进自封袋重新密封; 无色的显色液对光敏感, 因此要避免直接暴露在光线下。
2. 使用之前将所有试剂温度回升至室温 (20—25℃)。室温低于 20℃ 或试剂及样本没有回到室温可能导致所有样品的 OD 值偏低。使用之后立即将所有试剂放回 2—8℃ 冰箱。
3. 严格控制反应时间和时间, 并尽量使用移液器加样; 结果判定以酶标仪读数为准。
4. 试剂混合要均匀, 否则会出现重复性不好的现象。
5. 在所有恒温孵育过程中, 避免光线照射, 用封板膜封住微孔板。
6. 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。
7. 反应终止液为 1N 硫酸, 应避免接触皮肤和衣物。
8. 不要使用过了有效日期的试剂盒, 稀释或掺杂使用会引起灵敏度、OD 值的变化。不要交换使用不同批号的盒中试剂。
9. 显色液若有任何颜色表明变质, 应当弃之。当零标准品的吸光度值小于 0.6 时, 表示试剂可能变质。

【存储条件和有效期】

贮存条件: 在 2—8℃ 保存试剂盒。

有效期: 本试剂盒有效期为 12 个月。

本产品仅供研究使用。