

甲氧苄氨嘧啶检测试剂盒使用说明书

(酶联免疫法)

1 原理及用途

本试剂盒采用竞争 ELISA 方法检测组织、饲料、尿样和血清等样品中的甲氧苄氨嘧啶 (Trimethoprim, **TMP**)，试剂盒由预包被甲氧苄氨嘧啶抗体的酶标板、TMP 酶标记物、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，样本中的甲氧苄氨嘧啶和 TMP 酶标记物竞争酶标板上预包被的甲氧苄氨嘧啶抗体，用 TMB 底物显色后，样本吸光度值与样本甲氧苄氨嘧啶含量成负相关，与标准曲线比较即可得出样本中甲氧苄氨嘧啶的残留量。

2 技术指标

2.1 试剂盒灵敏度: **0.015ppb(ng/ml)**

2.2 反应模式: **37°C, 45min~15min**

2.3 检测下限:

饲料.....	0.8ppb
组织(鱼/虾/肉/肝脏/肾脏).....	0.2ppb
血清/尿液/血浆.....	0.2ppb

2.4 交叉反应率:

甲氧苄氨嘧啶.....	100%
磺胺吡啶.....	<0.1%
磺胺.....	<0.1%
磺胺嘧啶.....	<0.1%
磺胺异噁唑.....	<0.1%
磺胺噻唑.....	<0.1%
磺胺甲基嘧啶.....	<0.1%
磺胺多辛.....	<0.1%

2.5 样本回收率:

饲料.....	85%±10%
组织(鱼/虾/肉/肝脏/肾脏).....	85±15%
血清/尿液/血浆.....	85±10%

3 试剂盒组成

酶标板.....	96 孔
标准液(黑盖): 各 1ml	0ppb、0.015ppb、0.045ppb、0.135ppb、0.405ppb、1.215ppb
高标准液: 100ppb.....	1ml
酶标记物(红盖).....	5.5ml
底物液 A(白盖).....	6ml
底物液 B(黑盖).....	6ml
终止液(黄盖).....	6ml
2×复溶液.....	50ml
20X 浓缩洗涤液(白盖).....	40ml
说明书.....	1 份

4 需要的器材和试剂

4.1 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）

4.2 微量移液器：单道 20 μ l-200 μ l，100 μ l-1000 μ l、多道 300 μ l

4.3 试剂：无水甲醇、正己烷、盐酸、氢氧化钠

5 样本前处理

5.1 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。

5.2 配液：

配液 1：1 \times 复溶液

将 2 \times 复溶液用去离子水 2 倍稀释。

配液 2：0.1M 盐酸

取浓盐酸 10ml 加入到 1200ml 离子水中。

配液 3：1M 氢氧化钠

取氢氧化钠 4g 加入到 100ml 离子水中。

5.3 样本前处理步骤：

5.3.1 饲料处理方法

1) 称取 2g 粉碎样品于 50ml 离心管中，加 20ml 0.1M 盐酸，振荡 15 分钟，室温 3000 转/分离心 10 分钟；

2) 取 1ml 上清到 1.5ml 离心管，加入 55 μ l 1M 氢氧化钠调节 PH 值到 6-8，混匀（针对不同的饲料样品可以调节 1M 氢氧化钠的用量），室温 3000 转/分离心 10 分钟；

3) 取 0.5ml 上清到另一 1.5ml 离心管，加入 0.5ml 的 1 \times 复溶液，混匀；

3) 取 50 μ l 进行分析。

样本稀释倍数：20 检测下限：0.8ppb

5.3.2 组织（鱼/虾/肉/肝脏/肾脏）处理方法

1) 取除去脂肪的匀浆组织 2g 于 50ml 离心管中，加入 6 ml 无水甲醇和 2ml 正己烷，最大速度涡旋振荡 5 分钟；

2) 室温 4000 转/分离心 10 分钟，去除上层正己烷层，移取 0.5ml 下层清液到洁净玻璃试管试管（避免触碰脂肪层）；

3) 在 50-60 $^{\circ}$ C 下氮气吹干或蒸干样品；

4) 加入 400 μ l 的 1 \times 复溶液和 500 μ l 正己烷，最大速度涡旋振荡 1 分钟；

5) 转入 1.5ml 离心管，室温 4000 转/分离心 5 分钟，去除上层正己烷层，移取 50 μ l 下层清液进行分析。

样本稀释倍数：5 检测下限：0.2ppb

5.3.3 尿液/血清/血浆处理方法

1) 取 0.5 ml 样品，室温 4000 转/分离心 5 分钟；

2) 取 50 μ l 上清液，加入 200 μ l 1 \times 复溶液，混匀；

3) 取 50 μ l 用于检测。

样本稀释倍数：5 检测下限：0.2ppb

（如果需要，可以加大 1 \times 复溶液的用量来加大稀释倍数）

6 酶联免疫试验步骤

将所需试剂从 4 $^{\circ}$ C 冷藏环境中取出，置于室温平衡 30min 以上，洗涤液冷藏时可能会有结晶需恢复到室温以充分溶解，每种液体试剂使用前均须摇匀。取出需要数量的微孔板及框架，将不用的微孔板放入自封袋，保存于 2-8 $^{\circ}$ C。

实验开始前，用去离子水将 20 \times 浓缩洗涤液按 20 倍稀释成工作洗涤液。

6.1 编号：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。

6.2 加样反应：加标准品或样本 50 μ l/孔到各自的微孔中，然后加酶标记物 50 μ l/孔，用盖板膜封板，轻轻振荡 5 秒混匀，37 $^{\circ}$ C 反应 45 分钟。

6.3 洗涤：小心揭开盖板膜，将孔内液体甩干，用工作洗涤液 250 μ l/孔充分洗涤 5 次，每次间隔 30 秒，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）。

6.4 显色：每孔加入底物液 A 50 μ l，再加底物液 B 50 μ l，轻轻振荡 5 秒混匀，37 $^{\circ}$ C 避光显色 15 分钟。

6.5 终止：每孔加入终止液 50 μ l，轻轻振荡混匀，终止反应。

6.6 测吸光值：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。

7 结果分析

7.1 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

$$\text{百分吸光度值 (\%)} = \frac{A}{A_0} \times 100\%$$

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，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。

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）

8 注意事项

8.1 室温低于 25 $^{\circ}$ C 或试剂及样本没有回到室温（25 $^{\circ}$ C）会导致所有标准的 OD 值偏低。

8.2 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。

8.3 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。

8.4 在所有孵育过程中，用盖板膜封住微孔板，避免光线照射。

8.5 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。

8.6 显色液若有任何颜色表明变质，应当弃之。0 标准的吸光度值小于 0.5 个单位（A_{450nm} < 0.5）时，表示试剂可能变质。

8.7 反应终止液有腐蚀性，避免接触皮肤。

9 贮藏及保存期

储藏条件：试剂盒于 2-8 $^{\circ}$ C 保存，避免冷冻。

保质期：该产品有效期为 1 年，生产日期见包装盒。