

β -兴奋剂 ELISA 检测试剂盒

简介

克伦特罗 (Clenbuterol) 与沙丁胺醇 (Salbutamol) 分别属于众多哮喘药 [β -兴奋剂] (β -Agonist) 中最重要两种, 猪农使用这两种化学物可增加猪只的瘦肉比例, 以提高售价, 但这类药物有许多副作用, 轻则导致心跳及心律不正常, 严重者则可引发心脏病。近年来, 发生许多因 β -兴奋剂残留过量导致中毒的案例, 因此, 此类药物残留的检测已是猪肉普遍流通的区域相当重要的一大课题。

传统上, 药物残留的检测普遍利用 HPLC 与 TLC 来进行, 然而, 根据过去经验, 克伦特罗 / 沙丁胺醇样品处理方式既费时又费成本; 因此, 必须简化样品处理方式, 并利用敏感度较高的酶联免疫检测方法进行检测, 方可去除以上种种缺点。

本公司新研发的 β -兴奋剂 (β -Agonist) 酶联免疫检测试剂, 使用既简便、费时又短, 整个操作过程不到 80 分钟即可完成, 针对血清的检测灵敏度更可达 0.2ppb, 因此, 已成为广泛用来检测 β -兴奋剂残留的检测试剂盒。

反应原理

本公司的 β -兴奋剂 (β -Agonist) 酶联免疫定量检测试剂盒, 主要是利用抗原与抗体的特异性免疫化学反应的基本原理来进行的, 换句话说, 就是利用酶标记物与样品中的克伦特罗或沙丁胺醇对微孔中的抗体来进行竞争反应。

在整个反应当中, 如果样品中的克伦特罗或沙丁胺醇残留的越多, 相对地就会竞争掉越多的酶标记物, 使得能结合上抗体的酶标记物相对地就会很少, 因此, 反应中的酶标记物-底物的呈色就会很淡, 甚至几乎没有颜色, 此即为阳性反应; 反之, 若样品中没有含克伦特罗, 则呈色会比较深, 与阴性标准品呈色几乎是一样的, 此即为阴性反应。

试剂盒组成

- 1、微量测试孔板 (Microtiter well plate): 每条 8 孔, 一板 12 条。
- 2、克伦特罗标准品溶液 (Clenbuterol standard):
0 ppb、0.1 ppb、0.25 ppb、0.65 ppb、1.60 ppb、4.0 ppb 各一瓶, 1.0 mL / 瓶。
- 3、10 倍浓缩清洗液 (10X Concentrate Washing Solution): 一瓶, 50 mL / 瓶。
- 4、50 倍浓缩酶标记物 (50X Concentrate Enzyme Conjugate): 一瓶, 0.3 mL / 瓶。
- 5、酶标记物稀释液 (Enzyme Conjugate Dilution Solution): 一瓶, 18 mL / 瓶。
- 6、样品稀释液 (Sample Dilution Solution): 一瓶, 50 mL / 瓶。
- 7、底物 (Substrate Solution, TMB): 一瓶, 12 mL / 瓶。
- 8、反应终止液 (Stop Solution): 一瓶, 13 mL / 瓶。

试剂盒使用说明

A、注意事项

1、将待测样品、微量测试孔板、标准品溶液 6 瓶、10 倍浓缩清洗液、50 倍浓缩酶标记物、酶标记物稀释液、样品稀释液、底物、反应终止液, 于室温环境下, 至少回温 40 分钟。

2、1 倍清洗液配制。

利用蒸馏水将 10 倍浓缩清洗液以 1:9 之比例稀释 (即 1 mL 浓缩清洗液 + 9 mL 蒸馏水), 即可作为清洗微孔使用及饲料稀释使用的 1 倍清洗液。(10 倍浓缩清洗液请回温后使用, 并请检查溶液底部的结晶是否完全溶解。)

3、1 倍酶标记物配制。

用酶标记物稀释液将 50 倍浓缩酶标记物以 1:49 的比例稀释（即 0.1 mL 50 倍浓缩酶标记物+ 4.9 mL 酶标记物稀释液），即完成 1 倍酶标记物配制。稀释后的酶标记物请尽快使用，若保存于-20 °C，保存期可达一个月；若保存于 2~8 °C，请勿超过一星期。

4、用剩余的测试条孔则放回铝箔袋中，储存于 2~8 °C 冰箱。

B、本试剂盒未提供的试剂

99 % 甲醇（Methanol）

1N 及 0.5 N 氢氧化钠溶液（NaOH Solution）

1N 及 0.05 N 盐酸溶液（HCl Solution）

C、样品制备

本试剂可检测尿液/血清/饲料及肉类中残留的克伦特罗与沙丁胺醇：

1、尿液的检测，请依以下方法进行稀释（3 倍稀释）。

取 0.1 mL 尿，加入 0.2 mL 样品稀释液以 1:2（3 倍）稀释待用。

若样品的透明度较差，或浊度较高，则建议过滤或以离心机离心 10 分钟（3000 rpm），取上清液 30 μL 到微量测试孔内进行测试分析。

计算结果时务必将稀释倍数（3×）换算回去。

样品敏感度: 0.3 ppb

稀释倍数: 3

2、血清的检测，请依以下方法进行。

取 0.5 mL 血清，加入 0.5 mL 样品稀释液以 1:1（2 倍）稀释。

震荡混合均匀，取 30 μL 加入到微量测试孔内进行测试分析。

计算结果时务必将稀释倍数（2×）换算回去。

样品敏感度: 0.2ppb

稀释倍数: 2

3、待测物为饲料，则依以下方法进行分析。

取 1 g 已磨碎的待测饲料，加入 1 mL 1N 盐酸以及 9 mL 蒸馏水，以试管振荡器（Mixer）震荡混合约 0.5 分钟后再使用混和器（Roller）混和 15 分钟。

以离心机离心 15 分钟（3000 rpm），倒出所有上清液到新试管内，再加入 0.5 mL 1N 氢氧化钠溶液于这支具有上清液的新试管。

以试管振荡器震荡混合约 0.5 分钟，再以离心机离心 15 分钟（3000 rpm），取上清液 0.5 mL 与 1 倍清洗液 3.5 mL 以 1:7（8 倍）稀释。

取 30 uL 直接进行分析。

计算结果时务必将稀释倍数（80×）换算回去。

样品敏感度: 8 ppb

稀释倍数: 80

4、若待测物为组织样本（肉类、肝脏），则依以下方法进行分析。

取 4 g 已均质组织样本置入 50 mL 离心管中，再加入 6 mL 0.05 N 盐酸，以试管振荡器（Mixer）震荡混合约 0.5 分钟，接着使用混和器（Roller）混和 20 分钟后，以离心机离心 15 分钟（3000 rpm）。

INGENASA

雅雷萨

取上清液 0.5 mL 到 15 mL 离心管后再分别加入 0.25 mL 0.5 N 氢氧化钠溶液及 0.25 mL 样品稀释液后，以试管振荡器震荡混合约 0.5 分钟。

以离心机离心 15 分钟（3000 rpm）后取上清液 30 uL 加入至微量测试孔内进行测试分析。

计算结果时务必将稀释倍数（5×）换算回去。

样品敏感度: 0.5 ppb

稀释倍数: 5

5、猪毛样品：

(1) 称 0.05 克清洗后的猪毛加入 1 mL 2M NaOH 放入 50 mL 离心管中。

(2) 先静置 10 分钟后再用沸水煮 10 分钟，并给予适度的晃动。

(3) 于室温静置冷却约 30 分钟。

(4) 加入 1.5 mL 2M Glycine，震荡混合约 0.5 分钟。

(5) 加入 10 mL Isobutyl Alcohol 后震荡混合约 0.5 分钟。

(6) 3000rpm /10 min.取 1 mL 上层液到干净玻璃管中。

(7) 40 °C 氮气吹干(约 10 分钟)。

(8) 最后加入 1 mL 1x 样品稀释液进行回溶备用。

检品敏感度: 20 ppb

稀释倍数: 200

D、操作步骤

1、于适当检测孔分别加入 30 μL 标准溶液（0, 0.10, 0.25, 0.65, 1.60 与 4.00 ppb）。

2、在另外的检测孔加入 30 μL 已完成前处理的尿液或血清检品。

3、再于每一检测孔另再加入 120 μL 已稀释的酶结合物。

4、轻敲板子四周，使其充分混合后于室温下避光静置 50 分钟。

5、将检测孔中的反应液甩掉，再将洗液加满每一检测孔后甩掉，重复洗 3 次。

6、最后一次甩掉后，在吸水纸上拍干。

7、于每一检测孔加入底物 100 μL 后，轻敲板子四周，使其充分混合。

8、于室温下避光静置 20 分钟。

9、加入反应终止液，每一检测孔加入 100 μL。

10、用酶标仪（Microtiter plate spectrophotometer）以单波长 450 nm 或双波长 450 nm / 630nm（或 650 nm）判读。

E、判定

利用Excel将标准品浓度取Ln，与相对应吸光值之B/B0（相对于0值标准品吸光值之百分比）做线性回归分析（semi-log），再将待测样品的B/B0值代入，则可推算出待测检体浓度（如图1所示）。

$$\frac{\text{Absorbance standard (or sample)}}{\text{Absorbance (0 ppb standard)}} \times 100 = \frac{B}{B0} \%$$

例如：若标准曲线为图 1。

待测物吸光值除以标准品 0 ppb 值之吸光值 = X %

则待测物浓度 = $e^{[(45.123-X)/19.168]}$ ppb

F、检测下限(Detection limit)

本试剂盒最低检测下限皆为 0.10 ppb，此浓度的吸光值与阴性标准溶液（0 ppb）的吸光值有明显的差异。最高检测上限为 4.00 ppb，超出此浓度的样品需经适量稀释后再进行检测。

G、标准曲线(Standard curve)

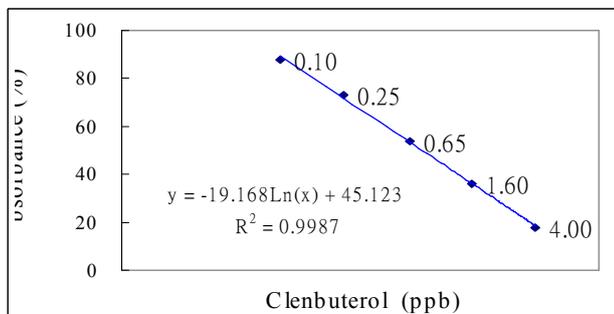


Fig.1: Calibration Curve for Clenbuterol Kits

H、再现性(Reproducibility)

针对克伦特罗检验试剂的精密度测试，在取样数 = 6 之下，所得不同浓度标准溶液的吸光值变异系数（CV%）如下图所示，显示克伦特罗试剂盒有很高的再现性：

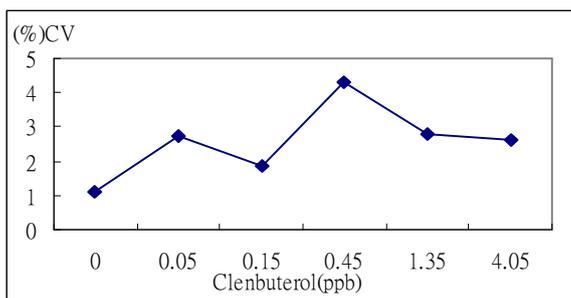


Fig.2 : Interassay Precision Profile for Clenbuterol Kits

I、交叉反应率(Cross-reactivity)

针对以下 β-兴奋剂进行特异性交叉反应测试，结果如下：

Compound	Cross-Reactivity (%)
Clenbuterol (克伦特罗)	100
Salbutamol (沙丁胺醇)	95
Bromobuterol (溴布特罗)	75
Tulobuterol (妥布特罗)	30
Terbutaline (特布它林)	5
Ractopamine (莱克多巴胺)	<0.01

经由上述表格换算，1.00 ppb Clenbuterol 相当于 1.05 ppb Salbutamol，1.33 ppb Bromobuterol，3.33 ppb Tulobuterol，20 ppb Terbutaline。

J、样品敏感度(Sensitivity)

检品	敏感度 (ppb)
尿液	0.3
血清	0.2
饲料	8.0
肉类	0.5
猪毛	20

K、回收率(Recovery rate)

检品 (外加 CB 浓度)	回收率 (%)
尿液 (添加 0.5 ppb)	80 ~ 120
血清 (添加 1.0 ppb)	80 ~ 120
饲料 (添加 10 ppb)	80 ~ 120
肉类 (添加 0.5 ppb)	80 ~ 120
猪毛 (添加 20 ppb)	80 ~ 120

L、Q & A

1、加入反应终止液后，没有吸光值或吸光值偏低。

i. 未加入酶标记物。

Ans: 请确实按照操作步骤进行。

ii. 试剂盒内容物未能充分回温。

Ans: 确定试剂盒内容物回温后再进行操作。

iii. 室温太低。

Ans: 若室温太低 (<19℃)，请于操作步骤 4，适度延长孵育时间(>60 分钟)。

iv. 未使用试剂盒的清洗液清洗。

Ans: 请用试剂盒内所提供的清洗液清洗。

v. 试剂盒已过有效期限。

Ans: 请更换仍在有效期限内的试剂盒。

vi. 终止实验后太久未判读。

Ans: 请于加入反应终止液后 20 分钟内判读。

2. 标准曲线线性不佳，或是平行性不佳。

i. 孵育位置避光不确实或受到气流干扰。

Ans: 请确认孵育位置既不透光也不透风（如抽屉内）。

ii. 操作时间拖太久。

Ans: 请在方法熟练后再进行操作。

iii. 微孔间相互污染。

Ans: 加样品时，请小心勿溅出微孔外，造成其它微孔的污染。

iv. 标准品或酶标记物所加入的量不一致。

Ans: 请使用已校正过的移液器，并确保其与吸头之间有高度密合性。

v. 添加样品或试剂的操作方法不正确。

Ans: 加样品或试剂时，吸头请勿接触微孔。

vi. 洗板过程发生问题（如管路堵塞、洗完板后未立刻进行下一步骤）。

Ans: 请随时监控洗板机洗板过程，洗完后立即进行下一步骤。

3. 吸光值均偏高（或线性不够陡）

i. 室温太高（ $>25^{\circ}\text{C}$ ）。

Ans: 若无法降低室内温度，请适度缩短步骤 4 的反应时间（ <60 分钟）。

ii. 底物溶液（TMB）受到污染。

Ans: 若发现底物溶液已呈现淡蓝色，请勿再使用。

iii. 反应时间超过太久。

Ans: 请控制反应时间。

iv. 酶标记物污染了盒内其它试剂。

Ans: 使用过的吸头应立即丢弃，可避免试剂间相互污染，凡是试剂（特别是酶标记物与底物溶液）接触过的容器应立即清洗干净（先以漂白水浸泡，再以清水冲洗干净，可确保无残留）。

4. 阴性标准品的吸光值低于阳性标准品的吸光值

i. 微孔中的试剂未能充分混合。

Ans: 试剂加完后，记得需轻敲板四周使其充分混合均匀。

ii. 洗板过程发生问题（同 2-vi）。

Ans: 请参考 2-vi。

iii. 添加样品或酶标记物的量不一致。

Ans: 请参考 2-iv。