

莱克多巴胺 ELISA 检测试剂盒**简介**

莱克多巴胺 (Ractopamine 本文简称为 Rac), 属 β -兴奋剂 (beta-agonist) 的一种, 若添加于饲料中喂食猪只等动物, 可使脂肪减少而增加肌肉的比例, 但包括中国在内的等世界各国认定其为成长激素而禁止使用。

目前普遍利用 HPLC、GC-MS 进行 Rac 的残留检测, 相较于高成本的仪器分析, 酶联免疫检测法可提供一种经济、便利、低成本的检测方法。本莱克多巴胺酶联免疫检测试剂盒, 经简单的前处理步骤, 约 1 个小时即可完成 ELISA 检测, 本试剂盒在检验血清、尿液及肉样时其灵敏度可达 0.3ppb。

反应原理

本产品主要是利用抗原与抗体的特异性免疫反应的基本原理来进行的。换句话说就是利用酶标抗原与样品中的莱克多巴胺对微孔中的抗体进行竞争反应, 进而定量检测出样品中的莱克多巴胺的浓度。

在整个反应过程中, 如果样品中的莱克多巴胺残留的越多, 相对地就会竞争掉越多的酶标抗原, 使得能结合上抗体的酶标抗原相对地就会减少, 因此反应呈色就越浅, 甚至几乎没有颜色, 此即为阳性反应; 反之, 样品中没有莱克多巴胺, 则呈色几乎和阴性标准品 (0ppb) 呈色一样深, 此即为阴性反应。

试剂盒组成

- 1、微量测试孔 (microtiter well): 每条 8 孔, 每板 12 条
- 2、莱克多巴胺标准溶液 (Ractopamine standards):
0ppb、0.03ppb、0.06ppb、0.12ppb、0.25ppb、0.5ppb 各 1 瓶, 1mL/瓶
- 3、5 倍浓缩萃取稀释液 (5X Extraction Diluent): 1 瓶, 40mL/瓶
- 4、10 倍浓缩清洗液 (10X Washing Solution): 1 瓶, 25mL/瓶
- 5、100 倍莱克多巴胺浓缩酶标记物 (100Xconc.Enzyme Conjugate): 1 瓶, 150ul/瓶
- 6、底物溶液 (Substrate solution, TMB): 1 瓶, 12mL/瓶
- 7、反应终止液 (Stop Solution): 1 瓶, 13mL/瓶

试剂盒使用说明**A、注意事项**

- 1、试剂盒保存于 2-8℃。检测前将试剂盒取出置于室温下, 至少回温 1 小时。
- 2、回温后, 取出所需的微量测试孔条, 将剩余的微孔条立即放回铝箔袋中, 置于 2~8℃ 保存。
- 3、1 倍的萃取稀释液配制: 取 1 份 5 倍的浓缩萃取稀释液加 4 份的蒸馏水稀释, 即成为 1 倍的萃取稀释液方可使用。
- 4、1 倍的清洗液配制: 取 1 份 10 倍浓缩清洗液加 9 份的蒸馏水稀释之, 即成为 1 倍的清洗液方可使用。
- 5、1 倍的酶标记物配制: 取 10ul 的 100 倍 Rac 酶标记物加 1mL 的 1 倍的萃取稀释液稀释之, 即成为 1 倍的酶标记物方可使用, 请现配现用。

B、本试剂盒未提供的试剂配制说明

- 1、3% TCA (Trichloro acetic acid): 取 3 克的 TCA 补蒸馏水至 100 mL, 并混合均匀备用。
- 2、1 M Tris-Base: 取 6.05 克的 Tris-Base 补蒸馏水至 50 mL, 并混合均匀备用。
- 3、2M NaOH: 取 8 克的 NaOH 补蒸馏水至 100 mL, 并混合均匀备用。
- 4、2M Glycine: 取 15.01 克的 Glycine 补蒸馏水至 100 mL, 并混合均匀备用。
- 5、甲醇。

6、乙酸乙酯。

7、乙醇（酒精）纯度 $\geq 95\%$ 即可。

C、样品制备（猪尿液、猪血清、猪肉及饲料等残留的莱克多巴胺前处理方法）

备注：请使用新鲜样品，避免检测上的误差

1、猪尿样品

将猪尿先离心 3000 rpm(>1700 g) / 10 分钟，取上层 100 μ L 猪尿至 1.5 mL 离心管(eppendorf)中，再加入 900 μ L 1 倍萃取稀释液，混合备用。

样品敏感度: 0.3 ppb

稀释倍数: 10

2、猪血清样品

(1)血清先离心 3000 rpm (>1700 g) / 10 分钟后。

(2)取上层 100 μ L 血清至 1.5 mL 离心管(eppendorf)中，再加入 900 μ L 1 倍萃取稀释液，混合备用。

样品敏感度: 0.3 ppb

稀释倍数: 10

3、猪肉样品:

(1) 取 1 克已均质的样品放入 15 mL 离心管中，再加入 3 mL 3 %TCA，请上下震荡混合约 10 分钟。

(2) 震荡混合之后进行离心 3000rpm(>1700g) / 10 分钟。

(3) 离心后取上层中段清澈液 500 μ L 加入 1 M Tris-Base100 μ L 均匀混合。

(4) 取(3) 100 μ L + 1 倍萃取稀释液 110 μ L，混合备用。

样品敏感度: 0.3 ppb

稀释倍数: 10

4、饲料样品：

(1) 称取 1 克磨成粉的饲料至 15mL 的离心管，再加入 4 mL (甲醇: 乙醇($\geq 95\%$)= 1:1)。

(2) 震荡混合 3 分钟。

(3) 离心 3000 rpm (>1700 g) / 10 分钟。

(4) 取上层清澈液 1mL 至 10 mL 玻璃管。

(5) 50℃氮气吹干。

(6) 回溶加入 1 mL 的正己烷及 1mL 的 1 倍萃取稀释液混合 30 秒。

(7) 离心 3000 rpm (>1700 g) / 10 分钟。

(8) 取下层液 40 μ L +360 μ L 的 1 倍萃取稀释液，混合备用。

样品敏感度: 4.0 ppb

稀释倍数: 40

5、猪毛样品：

(1) 称 0.1 克清洗后的猪毛加入 2 mL 2 M NaOH 放入玻璃管。

(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) 冷却约 30 分钟。

(4) 取 1 mL 猪毛分解液至 15mL 的离心管后再加入 1.5 mL 2M Glycine, 调 pH 至 9.6 $\pm$ 0.1 后混合均匀。

(5) 加入 5 mL Ethyl Acetate 后混合 30 秒。

- (6) 3000rpm /10 min.取 2 mL 上层液。
- (7) 40℃氮气吹干(约 10 分钟)。
- (8) 最后加入 2 mL 1 倍萃取稀释液进行回溶。
- (9) 取(8) 100μL + 1 倍萃取稀释液 300μL(400 倍稀释)，混合备用。

样品敏感度: **24 ppb**

稀释倍数: **400**

D、操作步骤

- 1、于适当微孔中分别加入 50 μL Rac 标准品溶液。
- 2、在另外的微孔中加入 50 μL 已完成前处理的样品溶液。
- 3、再于每一微孔中再加入 100 μL 1 倍的酶标记物(用 1 倍萃取稀释液配制)。
- 4、轻敲微孔板四周给予试剂充分混合并于室温避光下静置温育 30 分钟。
- 5、将微孔中的反应液甩掉，再将清洗液加满每一微孔后甩掉，重复洗 3 次。
- 6、第三次甩掉后，在吸水纸上拍干。
- 7、于每一微孔中加入 100 μL 底物溶液。
- 8、轻敲微孔板四周给予试剂充分混合于室温避光下静置温育 20 分钟。
- 9、最后再于每一微孔中加入 100 μL 的反应终止液。
- 10、用酶标仪以单波长 450 nm 或双波长 450 nm / 650 nm 读值。

E、判定

利用Excel将标准品浓度取Log，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，则可推算出待测样品浓度（如图Fig. 1所示）。

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

例如：若标准曲线为 Fig.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 = $e^{[(4.7021-X)/21.258]}$ ppb

备注：计算待测物浓度时记得回乘稀释倍数。

F、检测下限(Detection limit)

本试剂盒的平均检测下限为 0.03ppb, 此浓度之吸光值与阴性标准溶液(0ppb)的吸光值有明显的差异。

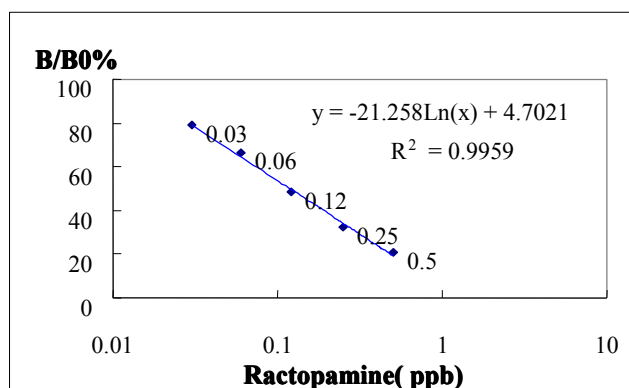
G、标准曲线(Standard curve)

Fig.1: Calibration Curve for Ractopamine Kits

H、再现性(Reproducibility)

针对莱克多巴胺检测试剂盒精密度测试，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，显示本产品有很高的再现性:

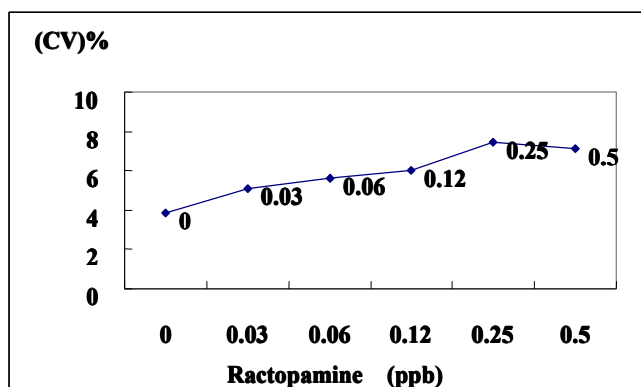


Fig.2 : Interassay Precision Profile for Ractopamine Kits

I、特异性(Specificity)

针对以下药物进行交叉反应之测试，结果如下:

药物名称	交叉反应 (%)
Ractopamine	= 100
Clenbuterol (CB1000ppb 其 B / Bo 约 70% 相当于有 0.065 ppb 的 Rac)	< 0.006
Salbutamol	< 0.001
Terbutaline	< 0.001
Tulobuterol	< 0.001
Isoprotenerol	< 0.001
Sulfamerazine	< 0.001

J、样品敏感度(Sensitivity)

检品	敏感度 (ppb)
猪尿	0.3
血清	0.3
猪肉	0.3
饲料	4.0
猪毛	24.0

K、回收率(Recovery rate)

检品 (外添加 Rac)	回收率 (%)
猪尿 (0.5 ppb)	90~130
血清 (0.5 ppb)	90~130
猪肉 (0.5 ppb)	85~125
饲料 (8 ppb)	75~125
猪毛 (40 ppb)	90~130

* 计算样品外添加回收率时,不需扣除阴性样品的背景值浓度(因样品在稀释过程中已抵消背景值)。

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: 若室温太低小于 19℃，请于 D.操作步骤 4，适度延长孵育时间。

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。

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光（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℃）。

Ans: 若无法降低室内温度，请适度缩短 D.操作步骤 9 之反应时间。

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。