

喹诺酮多合一 ELISA 检测试剂盒**简介**

喹诺酮类抗生素(QNS)常用于防止在大型畜产动物或养殖鱼的饲养形态下,因饲养密度过高所造成的感染症状:尤其对于肺脏、泌尿及消化系统的细菌感染,喹诺酮类抗生素可达到预防与治疗的效果。然而,喹诺酮类抗生素对人体常引发的副作用包括:胃肠道及头晕、失眠、头痛等中枢神经系统反应。

近十年来,由于喹诺酮类抗生素用于大型畜产动物或养殖鱼的饲养明显增加与社会大众对于食品健康的日益重视,国际社会趋向于避免使用喹诺酮类抗生素于大型畜产动物或养殖鱼的饲养。因此,监测喹诺酮类抗生素残留成为把守大众健康刻不容缓的议题。

传统上,一般是以 HPLC 筛选喹诺酮类抗生素残留量,再以 LC/MS/MS 进行最后确认;然而,此过程花费太多时间与经费。有鉴于此,本公司开发出定量流程少于 90 分钟的喹诺酮类多合一酶联免疫检验试剂盒,本试剂盒操作简便且省时、经济、检测范围广(水产类与农畜类样品皆可适用),且检测灵敏度高(鸡肉、猪肉或鱼虾类样品的最低检测灵敏度可达 0.45ppb)。

反应原理

我公司所研发的喹诺酮类(Quinolones, QNS)酶联免疫定量检验试剂盒,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喹诺酮对微孔中的抗体来进行竞争反应。

在整个反应当中,如果样品中的喹诺酮类抗生素残留的越多,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,若样品中没有含喹诺酮类抗生素残留,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(Microtiter well): 微量测试孔: 每条 8 孔, 一板 12 条。
- 2、喹诺酮标准溶液(Quinolones standards):
0 ppb、0.3 ppb、1.1 ppb、3.3 ppb、10 ppb、30 ppb 各一瓶, 1.5 mL / 瓶。
- 3、10 倍浓缩萃取稀释液(10X conc. Extraction Diluent): 一瓶, 50 mL / 瓶。
- 4、10 倍浓缩清洗液(10X conc. Washing Solution): 一瓶, 50 mL / 瓶。
- 5、200 倍喹诺酮酶标记物(200X Conc. QNS Enzyme Conjugate): 一瓶, 0.1 mL / 瓶。
- 6、底物(Substrate solution; TMB): 一瓶, 12 mL / 瓶。
- 7、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、使用前请先将喹诺酮标准溶液 6 瓶、萃取试样稀释液、酶标记物、底物及微量测试孔条置于室温下,至少回温 30 分钟。
- 2、回温后,取出所需微量测试孔条,将剩余未测的孔条立即放回铝箔袋中,置于 2-8 °C 保存。
- 3、10 倍浓缩萃取稀释液与 10 倍浓缩清洗液请用蒸馏水稀释 10 倍后使用,即浓缩稀释液:蒸馏水=1+9 稀释,稀释后的 1 倍萃取稀释液和清洗液可于 2-8°C 保存一周。
- 4、1 倍喹诺酮酶标记物配制时,请用 1 倍萃取稀释液稀释将 200 倍喹诺酮酶标记物作 200 倍稀释即完成 1 倍酶标记物配制。亦即采用浓缩 200 倍喹诺酮酶标记物:1 倍萃取稀释液=1+199 的比例稀释,欲进行上板测试前方可稀释,过早稀释易造成数据偏差。

B、本试剂盒未提供的试剂配制说明**i、分析级甲醇 (Analyzed Methanol)**

80%甲醇: 100%甲醇 80ml + 1x 萃取稀释液 20ml

70%甲醇: 100%甲醇 70ml + 1x 萃取稀释液 30ml

60%甲醇: 100%甲醇 60ml + 1x 萃取稀释液 40ml

55%甲醇: 100%甲醇 55ml + 1x 萃取稀释液 45ml

25%甲醇: 100%甲醇 25ml + 1x 萃取稀释液 75ml

8%甲醇: 100%甲醇 2ml + 1x 萃取稀释液 23ml

4%甲醇: 100%甲醇 1ml + 1x 萃取稀释液 24ml

ii、正己烷 (n-Hexane)**iii.分析级乙醇(Analyzed Ethanol)**

35%乙醇: 100%乙醇 35ml + 1x 萃取稀释液 65ml

C、样品制备

本试剂可检测生乳、鸡肉、猪肉、鱼、虾、蛋…等残留的喹诺酮类抗生素:

1、待测物为生乳, 则依以下方法进行处理

取 1 ml 的待测生乳以离心机离心 20 分钟 (3500 rpm), 吸取中间液体层 200 μ L, 并加入 35%乙醇 800 μ L 稀释 5 倍。

样品敏感度: 2 ppb

稀释倍数: 5

2、待测物为鸡肉样品, 分别依灵敏度需求以下列方法择一进行:**方法一:**

i.将 2 g 已均质的样品放入 15 mL 离心管中, 再加入 4mL 25%甲醇 (Methanol)及 1N NaOH 50 μ L, 震荡混合 (vortex) 约 1 分钟, 以 60 $^{\circ}$ C 隔水加热约 10 分钟, 再以上下转动充分混合约 10 分钟。

ii.以离心机离心 15 分钟 (3500 rpm), 再吸取上层液中的底部以 1x 萃取稀释液再稀释 1.5 倍 (即上层液 200 μ L 加 1x 萃取稀释液 100 μ L)。

样品敏感度: 1.5ppb

稀释倍数: 4.5

方法二:

i.将 1g 已均质的样品放入 15 mL 离心管中, 再加入 3 mL 80%甲醇 (Methanol), 震荡混合 (vortex) 约 1 分钟, 再以上下转动充分混合约 10 分钟。

ii.以离心机离心 15 分钟 (3000 rpm), 取 1 mL 上层液 (80%甲醇) 至 10 mL 玻璃管中, 于 50 $^{\circ}$ C 下, 利用氮气将有机溶剂吹干。

iii.于此玻璃管中加入 0.5 mL 4%甲醇, 先将残余物完全溶解后 (若未能完全溶解, 可能会导致回收率降低), 再加入正己烷 (n-Hexane) 1mL, 震荡混合 (vortex) 约 20~30 秒钟。

iv.以离心机离心 15 分钟 (3000 rpm), 利用吸管吸去包含中间乳化层部分的上层液 (正己烷), 再吸取下层液备用。

样品敏感度: 0.45 ppb

稀释倍数: 1.5

3、待测物为猪肉及鱼类样品，分别依灵敏度需求以下列方法择一进行：

方法一：

- i. 将 2 g 已均质的样品放入 15 mL 离心管中，再加入 4 mL 25% 甲醇 (Methanol)，震荡混合 (vortex) 约 1 分钟，以 60℃ 隔水加热约 10 分钟，再以上下转动充分混合约 10 分钟。
- ii. 以离心机离心 15 分钟 (3500 rpm)，再吸取上层液中的底部以 1x 萃取稀释液再稀释 1.5 倍 (即上层液 200 μ L 加 1x 萃取稀释液 100 μ L)。

样品敏感度: 1.5ppb

稀释倍数: 4.5

方法二：

- i. 将 1g 已均质的样品放入 15 mL 离心管中，再加入 3 mL 80% 甲醇 (Methanol)，震荡混合 (vortex) 约 1 分钟，再以上下转动充分混合约 10 分钟。
- ii. 以离心机离心 15 分钟 (3000 rpm)，取 1 mL 上层液 (80% 甲醇) 至 10 mL 玻璃管中，于 50 °C 下，利用氮气将有机溶剂吹干。
- iii. 于此玻璃管中加入 0.5 mL 4% 甲醇，先将残余物完全溶解后 (若未能完全溶解，可能会导致回收率降低)，再加入正己烷 (n-Hexane) 1 mL，震荡混合 (vortex) 约 20~30 秒钟。
- iv. 以离心机离心 15 分钟 (3000 rpm)，利用吸管吸去包含中间乳化层部分的上层液 (正己烷)，再吸取下层液备用。

样品敏感度: 0.45 ppb

稀释倍数: 1.5

4、待测物为虾，则依以下方法进行萃取：

方法一：

- i. 将 2g 已均质的样品放入 15 mL 离心管中，再加入 4 mL 55% 甲醇 (Methanol)，震荡混合 (vortex) 约 1 分钟，再以上下转动充分混合约 10 分钟。
- ii. 以离心机离心 15 分钟 (3500 rpm)，再吸取上层液中的底部以 1X 萃取稀释液再稀释 1.5 倍 (即上层液 200 μ L 加 1 倍萃取稀释液 100 μ L)。

样品敏感度: 1.5 ppb

稀释倍数: 4.5

方法二：

- i. 将 1g 已均质的样品放入 15 mL 离心管中，再加入 3 mL 60% 甲醇 (Methanol)，震荡混合 (vortex) 约 1 分钟，再以上下转动充分混合约 10 分钟。
- ii. 以离心机离心 15 分钟 (3000 rpm)，取 1 mL 上层液 (60% 甲醇) 至 10 mL 玻璃管中，于 50℃ 下，利用氮气将有机溶剂吹干。
- iii. 于此玻璃管中加入 0.5 mL 8% 甲醇，先将残余物完全溶解后 (若未能完全溶解，可能会导致回收率降低)，再加入正己烷 (n-Hexane) 1 mL，震荡混合 (vortex) 约 20~30 秒钟。
- iv. 以离心机离心 15 分钟 (3000 rpm)，利用吸管吸去包含中间乳化层部分的上层液 (正己烷)，再吸取下层液备用。

样品敏感度: 0.45 ppb

稀释倍数: 1.5

5、待测物为全蛋，则依以下方法进行：

i. 将 1g 已均质的全蛋放入 15 mL 离心管中，再加入 3 mL 70% 甲醇（Methanol），并震荡混合（vortex）约 1 分钟。

ii. 以离心机离心 15 分钟（3500 rpm），再吸取上层液至干净离心管中，并以 1X 萃取稀释液再稀释 1.5 倍（即上层液 200 μ L 加 1 倍萃取稀释液 100 μ L）。

样品敏感度: 2 ppb

稀释倍数: 6

注: 若萃取过程中乳化现象太严重, 看不到下层液有澄清部分, 请先将玻璃管中大部分上层液 (**n-Hexane**) 取出, 剩余乳化部份再利用隔水加热 **80~100 $^{\circ}$ C** 约 **3** 分钟后, 即可大幅改善乳化现象。

D、操作步骤

- 1、于适当 well 分别加入 100 μ L QNS 标准溶液。
- 2、在另外的 well 加入 100 μ L 已完成前处理的样品溶液。
- 3、再于每一 well 另再加入 50 μ L 已稀释的 1X 酶标记物。
- 4、轻敲微孔板四周，使其充分混合后于室温下避光静置 50 分钟。
- 5、将 well 中的反应液甩掉，再将洗液加满每一 well 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 well 加入底物 100 μ L 后，轻敲微孔板四周，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 well 加入 100 μ L。
- 10、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，与相对应吸光值的 B / B₀（相对于 0 值标准品吸光值的百分比）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 1 所示）。

$$\frac{\text{Absorbance standard (or sample)}}{\text{Absorbance (0ppb standard)}} \times 100 = \frac{B}{B_0} \%$$

Example: 若标准曲线为 Fig.1

待测物吸光值除以标准品 0 ppb 值的吸光值 = X %

则待测物浓度 = $e^{[(58.789-X)/10.558]}$ ppb

F、检测下限(Detection limit)

本试剂盒的平均检测下限为 0.3 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。

G、标准曲线(Standard curve)

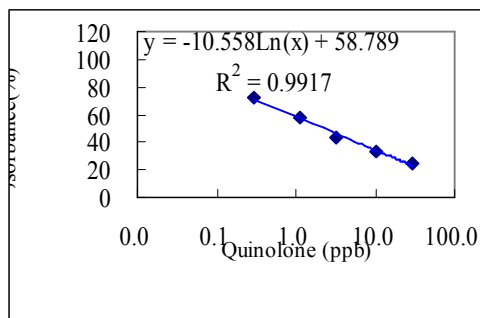


Fig.1: Calibration Curve for Quinolone Kits

H、再现性(Reproducibility)

针对喹诺酮检验试剂的精密测试，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，显示喹诺酮多合一检验试剂盒有很高的再现性：

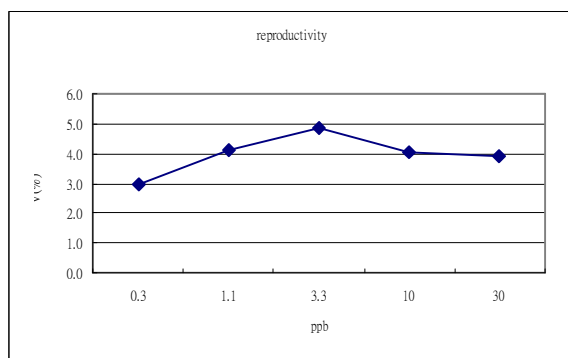


Fig.2 : Interassay Precision Profile for Quinolones Kit

I、特异性(Specificity)

针对以下抗生素进行交叉反应的测试，结果如下：

Enrofloxacin (恩诺沙星)	100%
Ciprofloxacin (环丙沙星)	102%
Pefloxacin (培氟沙星)	85%
Norfloxacin (诺氟沙星)	70%
Danofloxacin (单诺沙星)	65%
Ofloxacin (氧氟沙星)	60%
Oxolinic acid (恶喹酸)	55%
Flumequine (氟甲喹)	50%
Gatifloxacin (加替沙星)	47%
Lomefloxacin (洛美沙星)	31%
Enoxacin (依诺沙星)	25%
Fleroxacin (氟罗沙星)	15%
Levofloxacin (左氧氟沙星)	9%
Sarafloxacin (色拉沙星)	4%
Nalidixic acid (萘啶酸)	6%

J、样品敏感度(Sensitivity)

样品	敏感度 (ppb)
牛乳	2
鱼肉	0.45
鸡肉	0.45
虾	0.45
猪肉	0.45
蛋	2

K、回收率(Recovery rate)

生乳 (添加 2 ppb)	70~130%
鱼肉 (添加 0.45 ppb)	70~130%
鸡肉 (添加 0.45 ppb)	70~130%
虾 (添加 0.45 ppb)	70~130%
猪肉 (添加 0.45 ppb)	70~130%
蛋(添加 2ppb)	70~130%

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. 终止实验后未立刻判读。

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。

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℃)。

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: 请确实控制反应时间。

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。

ii. 添加样品或酶标记物的量不一致。

Ans: 请参考 2-iv。