

### 氯霉素 ELISA 检测试剂盒

#### 简介

氯霉素 (Chloramphenicol, CAP) 是一种广效性抗生素。由于其具有效果好以及价格低廉等优点, 因此目前已普遍应用于家畜禽的各种传染性疾病的治疗。然而氯霉素有其严重的副作用, 它已被证实会抑制人体骨髓造血功能而引起再生障碍性贫血症和粒状白细胞缺乏症等。近年来, 食品中的氯霉素残留对人类的健康造成了极大的威胁。因此, 发展快速、简便而且又准确的氯霉素检验试剂成为了近年来食品分析界十分关注的课题。

传统上常用 HPLC 与 TLC 来作为抗生素检测的方法, 但不仅效率不佳, 而且敏感度也不够。本公司所研发的氯霉素酶联免疫检验试剂盒, 操作既简便、费时又短, 整个 ELISA 操作过程不到 90 分钟即可完成。检测样品多 (生乳、蜂蜜、蜂王浆、鱼、虾、饲料与血清等), 特异性高, 不会与其它抗生素产生交叉反应, 且检测敏感度最低可达 0.025 ppb。

#### 反应原理

我公司所研发的氯霉素酶联免疫定量检验试剂, 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氯霉素对微孔中的抗体来进行竞争反应。

在整个反应当中, 如果样品中的氯霉素残留的越多, 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越少。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, 若样品中没有含氯霉素, 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 wells): 每条 8 孔, 一板 12 条。
- 2、氯霉素标准溶液 (Chloramphenicol Standards):  
0 ppb、0.025 ppb、0.05 ppb、0.1 ppb、0.3 ppb、0.6 ppb, 1.5 mL / 瓶
- 3、10 倍浓缩萃取稀释液 (10X Extraction Diluent): 一瓶, 30 mL / 瓶
- 4、10 倍浓缩清洗液 (10X Washing Solution): 一瓶, 30 mL / 瓶
- 5、氯霉素酶标记物 (Enzyme Conjugate): 一瓶, 8 mL / 瓶
- 6、底物溶液 (Substrate solution, TMB): 一瓶, 12 mL / 瓶
- 7、反应终止液 (Stop Solution): 一瓶, 12 mL / 瓶

#### 试剂盒使用说明

##### A、注意事项

- 1、使用前请先将本试剂盒回温至室温 (置于室温 60 分钟以上), 各溶液皆摇匀后方可使用。
- 2、回温后, 取出所需微量测试孔条, 将剩余未测的 ELISA 孔条立即放回铝箔袋中, 置于 4℃ 保存。
- 3、10 倍萃取稀释液与 10 倍清洗液请用蒸馏水稀释 10 倍方可使用。(如 1 mL 浓缩稀释液加 9 mL 蒸馏水) 稀释后的 1 倍萃取稀释液和 1 倍清洗液可于 4 °C 保存一周。
- 4、萃取流程请使用 P.P.材质的 15 mL 离心管以免腐蚀。
- 5、反应终止液含 0.5 N HCl, 请小心操作。
- 6、氯霉素标准溶液含氯霉素, 请小心操作。
- 7、本试剂盒的所有试剂出厂前均做过完整的测试, 请使用试剂盒提供的药品及试剂, 勿任意更换。
- 8、ELISA 所得的氯霉素浓度若低于该样品敏感度即可视为该样品背景值, 无须回乘稀释倍数。反之若所得的氯霉素浓度高于该样品敏感度, 即可能为氯霉素阳性样品, 建议再使用其它检测方法检测, 如 GC/MS

等。

9、进行生乳的样品制备时，在 ELISA 操作中请轻敲微孔板一到二分钟(D.操作步骤的第四点)。

10、阴性生乳的 OD 450 吸光值可能会高于标准品 0 ppb 的吸光值但不会影响对氯霉素阳性样品的判定。

### B、本试剂盒未提供的试剂配制说明

乙酸乙酯 (Ethyl acetate)

正己烷 (n-Hexane)

0.5 N 盐酸溶液 (HCl)

0.5 N 氢氧化钠溶液 (NaOH)

### C、样品制备

可检测生乳、蜂蜜、蜂王浆、鱼、虾、蟹、乌贼、鸡肉、猪肉、饲料及血清等残留的氯霉素：

1、待测物为生乳，请先参考注意事项第 9,10 点。

a.现配萃取稀释液：10 倍浓缩萃取稀释液用蒸馏水稀释 10 倍后使用。(如 1 mL 浓缩稀释液加 9 mL 蒸馏水稀释)

b.取 250  $\mu$ L 乳品放置 1.5 mL 微量小管中。

c.加入 750  $\mu$ L 现配一倍萃取稀释液，快速震荡 (vortex) 30 秒钟后备用。

**稀释倍数: 4**

2、待测物为蜂蜜，则依以下方法进行萃取：

a.取 2 g 蜂蜜、4 mL 蒸馏水与 4 mL 乙酸乙酯置入 15 mL 离心管中，震荡(vortex) 30 秒。

b.持续上下颠倒该离心管 10 分钟，使其充分混合均匀。

c.以离心机离心 1700 x g 10 分钟，取 1 mL 上层液(乙酸乙酯)至 10 mL 玻璃管中，于 50  $^{\circ}$ C 下，利用氮气将有机溶剂吹干。

d.加入 0.5 mL 萃取稀释液，震荡 (vortex) 30 秒钟后备用。

**稀释倍数: 1**

3、待测物为蜂王浆，则依以下方法进行萃取：

a.取 2 g 蜂王浆、3 mL 0.5 M NaOH 及 8 mL 乙酸乙酯置入 15 mL 离心管中，震荡 (vortex) 30 秒。

b.持续上下颠倒该离心管 10 分钟，使其充分混合均匀。

c.以离心机离心 1700 x g 10 分钟，取 2 mL 上层液(乙酸乙酯)至 10 mL 玻璃管中，于 50  $^{\circ}$ C 下，利用氮气将有机溶剂吹干。

d.加入 0.5 mL 萃取稀释液，震荡(vortex)30 秒钟后备用。

**稀释倍数: 1**

4、待测物为鱼、虾、蟹、乌贼、鸡肉、猪肉及血清，则依以下方法进行萃取：

a.将 3 克已均质的样品放入 15 mL 离心管中，再加入 6 mL 乙酸乙酯，震荡(vortex)5 分钟。

b.以离心机离心 1700 x g 10 分钟，取 2 mL 上层液(乙酸乙酯)至 10 mL 玻璃管中，于 50 $^{\circ}$ C 下，利用氮气将有机溶剂吹干。

c.于此玻璃管中加入正己烷 1 mL，先将残余物完全溶解后，再加入 1 mL 萃取稀释液，震荡(vortex)30 秒钟。

d.以离心机离心 1700 x g 10 分钟，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(水层)备用。

**稀释倍数: 1**

若待测物为白虾可依循以下流程将样品做 8 倍浓缩以增加样品敏感度

- a. 将 6 克已均质的样品放入 15 mL 离心管中，再加入 6 mL 乙酸乙酯，震荡(vortex)5 分钟。
- b. 以离心机离心 1700 x g 10 分钟，取 4 mL 上层液(乙酸乙酯)至 10 mL 玻璃管中，于 50℃下，利用氮气将有机溶剂吹干。
- c. 于此玻璃管中加入正己烷 2 mL，先将残余物完全溶解后，再加入 0.5 mL 萃取稀释液，震荡(vortex)30 秒钟。
- d. 以离心机离心 1700 x g 10 分钟，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(水层)备用。

**稀释倍数: 0.125**

5、待测物为饲料，则依以下方法进行萃取：

- a. 取 2 g 饲料与 4 mL 乙酸乙酯置入 15 mL 离心管中，震荡(vortex)30 秒。
- b. 持续上下颠倒该离心管 10 分钟，使其充分混合均匀。
- c. 以离心机离心 1700 x g 10 分钟，取 1 mL 上层液(乙酸乙酯)至 10 mL 玻璃管中，于 50 °C 下，利用氮气将有机溶剂吹干。
- d. 于此玻璃管中加入正己烷 1 mL，先将残余物完全溶解后，再加入 0.5 mL 萃取稀释液，震荡(vortex)30 秒钟。
- e. 以离心机离心 1700 x g 10 分钟，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(水层)稀释 10 倍后(如 50 μL 下层液加 450 μL 萃取稀释液)备用。

**稀释倍数:10**

6、待测物为全蛋，则依以下方法进行萃取：

- a. 取 1 g 全蛋液，加入 0.5N HCl 0.5 mL 后快速震荡(vortex)30 秒。
- b. 加入 4 mL 乙酸乙酯后快速震荡(vortex)30 秒使其混合均匀。
- c. 以离心机离心 1700 x g 10 分钟，取 2 mL 上层液(乙酸乙酯)至 10 mL 玻璃管中，于 50 °C 下，利用氮气将有机溶剂吹干。
- d. 于此玻璃管中加入正己烷 1 mL，先将残余物完全溶解后，再加入 0.5 mL 萃取稀释液，震荡(vortex)30 秒钟。
- e. 以离心机离心 1700 x g 10 分钟，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(水层)备用。

**稀释倍数: 1**

**注 1:**若乳化现象太严重，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 °C** 约 **3** 分钟后再离心，即可改善乳化现象。

**注 2:**因为利用 **Ethyl Acetate** 萃取的流程可能有溶剂的背景值过高的现象，因此建议若待测物使用 **Ethyl Acetate** 来做萃取，可多做一溶剂背景值的样品。待测物的浓度等于所得浓度减去溶剂背景值的浓度再乘以稀释倍数。

**注 3:**如何得到溶剂背景值的浓度

如该待测物的萃取流程，但不加待测物，从把适量的 **Ethyl Acetate** 移入玻璃管中做起到完成整个萃取流程。之后同待测物一起以 **ELISA** 做测试。

## D、操作步骤

本产品的酶标记物与氯霉素标准溶液均直接使用，无需再稀释

- 1、于适当微孔中分别加入 100  $\mu\text{L}$  CAP 标准溶液。
- 2、在另外的微孔中加入 100  $\mu\text{L}$  已完成前处理的样品溶液。
- 3、再于每一微孔另加入 50  $\mu\text{L}$  已完全回温的酶标记物。
- 4、轻敲微孔板四周，使其充分混合后于室温下避光静置 1 小时。
- 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 3 次。
- 6、最后一次甩掉清洗液后，在吸水纸上拍干。
- 7、于每一微孔加入底物 100  $\mu\text{L}$  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，每一微孔加入 100  $\mu\text{L}$ 。
- 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）。

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

例如：若标准曲线为图 1.

待测物吸光值除以标准品 0 ppb 值的吸光值 = X %

则待测物浓度 =  $e^{[(10.486-X)/18.149]}$  ppb x 该待测物的稀释倍数。

### F、检测下限(Detection limit)

本试剂盒的平均检测下限为 0.025 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)

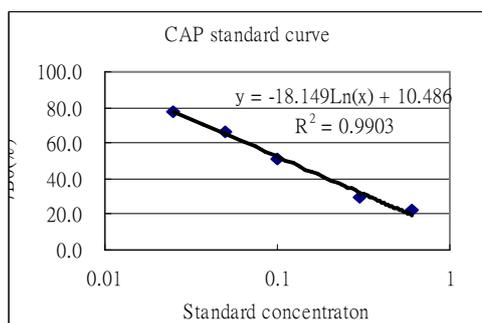


Fig.1: Calibration Curve for Chloramphenicol Kits

### H、再现性(Reproducibility)

针对氯霉素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，显示本产品的氯霉素试剂盒有很高的再现性：

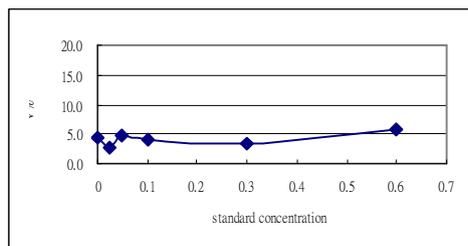


Fig.2 : Interassay Precision Profile for Chloramphenicol Kit

### I、特异性(Specificity)

针对以下抗生素进行交叉反应之测试，结果如下：

Chloramphenicol	100%
Chloramphenicol(free base)	1.4%
Gentamicin	<0.1%
Thiamphenicol	3.1%
Tetracycline	<0.1%
Penicillin G	<0.1%
Sulfamethazine	<0.1%

### J、样品敏感度(Sensitivity)

样品	敏感度 (ppb)
生乳	0.1 ppb
蜂蜜	0.1 ppb
蜂王浆	0.1 ppb
血清	0.025 ppb
鱼虾蟹鸡猪肉	0.025 ppb
饲料	0.25 ppb
蛋	0.025 ppb

### K、回收率(Recovery rate)

生乳	70~130%
蜂蜜	70~130%
蜂王浆	70~130%
鱼、虾、蟹、乌贼、鸡及猪肉	70~130%
饲料	70~130%
血清	70~130%
蛋	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: 若室温太低小于 19°C, 请于操作步骤 3, 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: 请与加入反应终止液后 5 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: 请先确认所有器材及药品齐全后确实依照本说明书的步骤进行操作。

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。

3. 吸光值均偏高 (或线性不够陡)

i. 室温太高 (>25°C)。

Ans: 若无法降低室内温度, 请适度缩短加入底物后的反应时间 (<20 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. 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. 添加样品或酶标记物的量不一致。

Ans: 请参考 2-iv。