

## 两性霉素酶联免疫分析（ELISA）

### 试剂盒使用说明书

本试剂盒仅供研究使用。

#### 1 使用目的：

本试剂盒用于饲料、鱼、虾和肉类组织（如鸡、牛肉和猪肉），鸡蛋、蜂蜜、牛奶、血清和尿样等相关样本中两性霉素残留的定量检测。

#### 2 实验原理

本试剂盒采用竞争 ELISA 方法，在微孔板包被有两性霉素偶联抗原，加入两性霉素标准品或样品，游离两性霉素与微孔条上预包被的两性霉素偶联抗原互相竞争抗两性霉素抗体酶标记物，用 TMB 底物显色，加入终止液后颜色由蓝色变为黄色，用酶标仪在 450nm 波长下进行检测，吸光值与样品中两性霉素含量成反比，通过标准曲线计算样品中两性霉素的含量。

#### 3 试剂盒组成

- 3.1 预包被的两性霉素偶联抗原的可拆酶标板：1 块（12 孔×8 条）。
- 3.2 两性霉素标准品：6 瓶（1ml/瓶），含量分别是：0 ppb, 0.1 ppb, 0.3 ppb, 0.9 ppb, 2.7 ppb, 8.1 ppb。
- 3.3 抗两性霉素抗体酶结合物：1 瓶（6ml）。
- 3.4 显色液 A：1 瓶（6ml）。
- 3.5 显色液 B：1 瓶（6ml）。
- 3.6 终止液：1 瓶（6ml），2M 硫酸。
- 3.7 样本稀释液：1 瓶（10×，6ml），用于样品稀释用。
- 3.8 浓缩洗涤液：1 瓶（20×，20ml），用于洗板。
- 3.9 说明书一份。

#### 4 需要而未提供的材料

##### 4.1 设备

- 4.1.1 波长 450nm 酶标仪。
- 4.1.2 粉碎机。
- 4.1.3 量筒。
- 4.1.4 振荡器。
- 4.1.5 漏斗。
- 4.1.6 Whatman No 1 或相当的滤纸。
- 4.1.7 微量移液器。

##### 4.2 试剂

- 4.2.1 去离子水或蒸馏水。
- 4.2.2 甲醇。

#### 5 贮存

- 5.1 试剂盒贮存于 2~8℃，切勿冷冻

5.2 未用完的微孔板应该密封干燥保存

## 6 注意事项

6.1 使用试剂盒前请仔细阅读说明书。

6.2 不要使用过期试剂盒。

6.3 试剂盒使用前，将试剂恢复至室温（ $25\pm 2^{\circ}\text{C}$ ），建议至少回温2小时。

6.4 标准品中含有两性霉素，使用时应特别注意，操作时应带手套。

6.5 终止液中含有硫酸，使用时防止灼伤皮肤及腐蚀衣物。

6.6 不同标准品、样品所用吸头不能混用，否则会影响试验结果。

6.7 不同批号试剂盒中的试剂不得混用；不同标准品、样品所用吸头不得混用，否则会影响实验结果。

6.8 稀释样本时必须用本试剂盒中的样本稀释液，否则会影响实验结果

6.9 混合试剂时应避免起泡。

## 7 工作液准备

7.1 两性霉素标准品溶液：0ppb,0.1ppb,0.3 ppb,0.9ppb,2.7 ppb,8.1ppb

7.2 浓缩洗涤液：用蒸馏水按1:20(1+19)稀释备用

7.3 样本稀释液：用蒸馏水按1:10(1+9)稀释备用

7.3 显色剂：已备用，避免光线直照

7.4 反应终止液：已备用

**8 样品处理程序**（样品在提取过程中，要严格按说明书操作，提取过程中应准确稀释，否则会出现结果不准确，样品应当保存在阴凉避光之处及冷藏保存）

8.1取10g粉碎的样品，加 20ml 70%甲醇溶液

8.2强力振荡3分钟

8.3用Whatman No 1滤纸过滤

8.4取25 $\mu\text{l}$ 处理后的样品，加入25 $\mu\text{l}$ 样本稀释液于反应孔中（样本稀释倍数为2）

## 9 酶免分析步骤

### 9.1 实验须知

9.1.1 实验开始前请将所有试剂于盒外充分恢复至室温（ $25\pm 2^{\circ}\text{C}$ ），时间约2小时。回温至室温（ $25\pm 2^{\circ}\text{C}$ ）后再取出微孔条，多余的微孔条重新密封立即于 $2\sim 8^{\circ}\text{C}$ 干燥保存

注：一定保证回温充分，否则影响检测的精确度和准确度。

9.1.2 使用后请立即将试剂放回 $2\sim 8^{\circ}\text{C}$ 保存

9.1.3 请不要改变分析程序

9.1.4 请使用精确的微量移液器

9.1.5 操作一旦开始，请不要中断任何程序

9.1.6 ELISA结果的可重复性极大程度的取决于操作程序，请严格按照要求操作

9.1.7 为避免交叉污染，每个标准品和样品均应使用不同的吸头加样

9.1.8 加样时请勿让吸头接触微孔中的溶液或内表面

### 9.2 分析步骤

9.2.1 预先进行编号，标记B0、标准品和样品的位置，推荐进行双孔检测

9.2.2 取所需数量的微孔（微孔条可拆），将多余板条重新密封并立即放回 $2\sim 8^{\circ}\text{C}$ 保存

9.2.3 样品稀释液（10 $\times$ ）、浓缩洗涤液（20 $\times$ ）稀释成工作液(蒸馏水或去离子水稀释)

9.2.4 在B0孔中加入50 $\mu\text{l}$  0.0 ppb标准品溶液

9.2.5 在各标准孔中加入50 $\mu\text{l}$ 的标准品溶液

9.2.6 在各样品孔中加入50 $\mu$ l样品溶液

9.2.7 在所有孔中加入50 $\mu$ l的抗两性霉素抗体酶结合物

9.2.8 轻轻晃动反应板几秒钟。

9.3 37 $^{\circ}$ C温浴30min（温浴过程中不时轻拍反应板，可以减少双孔误差）

9.3.1 甩掉孔中液体，用洗液洗涤微孔板5次，最后一次应在吸水纸上拍打以完全除去孔中液体。

9.4 反应

9.4.1 洗涤程序完成后，立即用微量移液器在每个微孔中先加入50 $\mu$ l显色液A，再加 50 $\mu$ l显色液B；轻微晃动反应板使之彻底混匀

9.4.2 37 $^{\circ}$ C温浴10min

9.4.3 每孔中加入50 $\mu$ l终止液，混匀

9.4.4 在450nm下检测吸光度，结果在5min内读取。

## 10 结果计算

10.1 定量分析

10.1.1 所获得的每个浓度标准溶液和样本吸光度值的平均值（B）除以第一个标准（0标准）的吸光度值（B0）再乘以100%，即百分吸光度值。

B—标准溶液或样本溶液的平均吸光度值

B0—0ppb标准溶液的平均吸光度值

10.1.2 以两性霉素浓度的对数值为X轴，百分吸光度值为Y轴，绘制标准曲线图。根据样品百分吸光度值，可从曲线上得到对应点的横坐标，即为两性霉素浓度的对数值，求得反对数即为测定液中两性霉素浓度C（ppb）

10.1.3 由于样品经过了预先稀释，因此根据标准曲线所得出的样品浓度一定要再乘以其稀释倍数。

10.2 半定量测定

10.1.1 目测半定量测定：首先选择一个适当的标准液与样品同运行，根据样品与标准品颜色深浅比较，判断样品浓度值是小于还是大于标准值。

10.1.2 仪器半定量测定：首先选择一个适当的标准液与样品同运行，根据样品与标准品吸光度值的高低比较，判断样品浓度值是小于还是大于标准值。

## 11 特异性

物质 交叉反应

两性霉素 100%

## 12 试剂盒参数

本试剂盒检测下限为0.05ppb

B0吸光度最佳值应大于1.0

试剂盒吸光度板内误差小于8%，板间误差小于15%。

用本说明书提供的组织样本提取方法回收率大于80%。

## 13

试剂盒提供的标准曲线范围为0.1ppb~8.1ppb。

## 14 分析限制

本试剂盒检测为阳性的样品应该用另一种方法如HPLC或GC/MS加以确证。

