



北京勤邦科技股份有限公司

莱克多巴胺残留酶联免疫检测试剂盒

一、概要

莱克多巴胺 (Ractopamine) 属于 β -兴奋剂药物, β -兴奋剂是营养重分配剂的一种, 是一类结构和功能类似肾上腺素和去甲肾上腺素的苯乙醇胺类衍生物, 它可以加快畜禽生长速度, 降低胴体脂肪含量, 提高瘦肉率。在欧盟 β -兴奋剂已被禁止用于家禽的生长促进剂, 我国在《禁止在饲料和动物饮用水中使用的药物品种目录》中也有明文规定, 但由于莱克多巴胺属于非处方药, 且价格远低于克仑特罗, 因此其非法应用者不断增多。

本试剂盒是应用 ELISA 技术研发的新一代药物残留检测产品, 操作时间仅需 40 min, 能最大限度地减少操作误差和工作强度。

二、试验原理

本产品采用间接竞争 ELISA 方法, 在酶标板微孔条上预包被上偶联抗原, 样本中残留的莱克多巴胺和微孔条上预包被偶联抗原竞争抗莱克多巴胺的抗体, 加入酶标二抗后, 用 TMB 底物显色, 样本吸光度值与其所含残留物莱克多巴胺的含量成负相关, 与标准曲线比较, 再乘以其对应的稀释倍数, 即可得出样本中莱克多巴胺的残留量。

三、适用范围

本产品可定性、定量检测尿液、组织 (肌肉、肝脏)、饲料和牛血清样本中莱克多巴胺的残留量。

四、交叉反应率

莱克多巴胺	100%
多巴酚丁胺	1%
克仑特罗	小于 0.1%
特布它林	小于 0.1%
沙丁胺醇	小于 0.1%

五、使用单位需自备的设备 & 仪器

设备:

- 微孔板酶标仪 450/630 nm
- 旋转蒸发仪/氮气吹干装置
- 电热恒温水浴锅
- 均质器
- 振荡器
- 涡旋仪
- 离心机

- 天平: 感量 0.01 g
- 刻度移液管: 10 mL
- 洗耳球
- 容量瓶: 500 mL
- 玻璃管: 10 mL
- 聚苯乙烯离心管: 2 mL、50 mL
- 微量移液器: 单道 20~200 μ L、100~1000 μ L
多道 250 μ L

试剂:

- 氯化钠 (分析纯)
- 甲醇 (分析纯)
- 浓盐酸 (分析纯)
- 氢氧化钠 (分析纯)
- 正己烷 (分析纯)
- 去离子水

六、提供的材料与试剂

- 96 孔酶标板 $\times$ 1 块 (包被有偶联抗原)
- 标准品 $\times$ 6 瓶: (1 mL/瓶) (1 μ g/L=1ppb=1 μ g/kg)
0 ppb, 0.05 ppb, 0.15 ppb, 0.45 ppb, 1.35 ppb, 4.05 ppb
- 高浓度标准品: (1 mL/瓶) 100 ppb
- 酶标二抗浓缩液 1 mL.....红色帽
- 抗体工作液 10 mL.....绿色帽
- 底物液 A 液 7 mL.....白色帽
- 底物液 B 液 7 mL.....红色帽
- 终止液 7 mL.....黄色帽
- 20 $\times$ 浓缩洗涤液 40 mL.....透明帽
- 20 $\times$ 浓缩复溶液 50 mL.....蓝色帽

七、溶液的配制

配液 1: 0.2 M 盐酸溶液

量取 8.3 mL 浓盐酸加入去离子水中定容至 500 mL, 混匀。

配液 2: 2% 氯化钠溶液:

称取 2.0 g 氯化钠加入 100 mL 去离子水溶解混匀。

配液 3: 2% 氯化钠-0.2 M 盐酸-甲醇混合液

量取 30 mL 2% 氯化钠溶液、30 mL 0.2 M 盐

酸溶液和 30 mL 甲醇混匀。

配液 4: 0.5 M 氢氧化钠溶液

称取 2.0 g 氢氧化钠加入 100 mL 去离子水溶解混匀。

配液 5: 复溶工作液

用去离子水将 2×浓缩复溶液按 1: 1 体积比进行稀释 (1 份 2×浓缩复溶液+1 份去离子水) 用于样本的复溶, 复溶工作液在 4℃环境可保存一个月。

配液 6: 洗涤工作液

用去离子水将 20×浓缩洗涤液按 1: 19 体积比进行稀释 (1 份 20×浓缩洗涤液+19 份去离子水) 用于酶标板的洗涤, 洗涤工作液在 4℃环境可保存一个月。

八、样本前处理步骤

样本处理前须知

处理任何样本时, 都必须注意:

- (a) 实验中必须使用一次性吸头, 在吸取不同的试剂时要更换吸头。
- (b) 实验之前须检查各种实验器具是否洁净, 必须使用洁净实验器具, 以避免污染干扰实验结果。
- (c) 处理好的样本于 30 min 内用于分析, 不能保存。
- (d) 肝脏样本要求用新鲜肝脏样本检测。

(一) 尿液样本前处理方法

-----取 20 μ L 清亮尿样直接测定 (如尿样浑浊必须通过过滤或 4000 r/min 离心 10 min 直至清亮), 暂不使用的样本应冷冻 (-20℃) 保存。

(二) 组织 (肌肉、肝脏) 样本前处理方法

-----称取 2.0 ± 0.05 g 均质后的样本至 50 mL 聚苯乙烯离心管中;

-----加入 4 mL 2%氯化钠-0.2 M 盐酸-甲醇混合液 (见配液 3), 用涡旋仪涡动 1 min, 4000 r/min, 离心 5 min;

-----**肝脏样本:** 取 0.5 mL 上清液 (若上层有悬浮物应避免) 至 2 mL 聚苯乙烯离心管中, 分别加入 20 μ L 0.5 M 氢氧化钠溶液 (见配液 4) 和 0.5 mL 复溶工作液 (见配液 5) 混匀;

-----**肌肉样本:** 取 0.5 mL 上清液 (若上层有悬浮物应避免) 至 2 mL 聚苯乙烯离心管中, 分别加入 35 μ L 0.5 M 氢氧化钠溶液 (见配液 4) 和 0.5 mL 复溶工作液 (见配液 5) 混匀;

-----取 20 μ L 用于分析。

注: 样本离心后不能保存, 应立即进行下一步操作, 处理好的样本应立即用于检测。(此步非常重要)

(三) 饲料样本前处理方法

-----称取 1.0 ± 0.05 g 均质后的饲料样本至 50 mL 聚苯乙烯离心管中;

-----加入 10 mL 甲醇, 用涡旋仪涡动 1 min, 4000 r/min, 离心 5 min;

-----移取 1 mL 上层有机相至 10 mL 洁净干燥玻璃管中, 于 50~60℃水浴氮气空气流下吹干;

-----加入 1 mL 正己烷, 用涡旋仪涡动 1 min, 再加入 1 mL 复溶工作液 (见配液 5), 用涡旋仪涡动 30 s, 4000 r/min, 离心 5 min;

-----去除上层有机相, 取 50 μ L 下层水相至 2 mL 聚苯乙烯离心管, 加入 200 μ L 复溶工作液 (见配液 5) 混匀;

-----取 20 μ L 用于分析。

(四) 牛血清样本前处理方法

-----抽取动物血液, 置于玻璃管中待其凝固, 4000 r/min, 离心 5 min;

-----吸取上层清亮液体 (血清), 用洗涤工作液 (见配液 6) 按 1: 1 体积比进行稀释 (1 份血清+1 份洗涤工作液), 用涡旋仪涡动 1 min, 混匀;

-----将样本置于 80℃电热恒温水浴锅中水浴 5 min;

-----取出样本, 待冷却至室温后取 20 μ L 用于分析。

九、检测步骤

测定前应须知:

1. 使用之前将模具内所有试剂与酶标板放实验桌上回温至室温 20~25℃。
2. 使用之后立即将所有试剂放回 2~8℃。
3. 在 ELISA 分析中的再现性, 很大程度上取决于洗板的一致性, 正确的洗板操作是 ELISA 测定程序中的要点。
4. 在所有恒温孵育过程中, 避免光线照射, 用盖板膜盖住微孔板。

操作步骤:

1. 将所需试剂从冷藏环境中取出, 按照上述方法进行回温, 注意每种液体试剂使用前均须摇匀。
2. 取出需要数量的微孔板, 将不用的微孔板放回铝箔袋重新真空密封, 保存于 2~8℃环境中。
3. 浓缩洗涤液和浓缩复溶液在使用前也需按上述方法回温。
4. **编号:** 将样本和标准品对应微孔按序编号, 每个样本和标准品做 2 孔平行, 并记录标准孔和样本孔所在的位置。
5. **加标准品/样本:** 加入标准品/样本 20 μ L 到对应的微孔中。
6. **抗体工作液和酶标二抗浓缩液的混合:** 将抗体工作液和酶标二抗浓缩液按 10: 1 体积比混合并混匀 (1 份酶标二抗浓缩液加入 10 份抗体工作液)。(注: 此混合液不能保存,

混合均匀后立即进行加样)

7. **加抗体工作液和酶标二抗浓缩液的混合液:** 加入抗体工作液和酶标二抗浓缩液的混合液 80 μL /孔, 轻轻振荡混匀, 用盖板膜盖板后置 25 $^{\circ}\text{C}$ 避光环境中反应 30 min。
8. **洗板:** 小心揭开盖板膜, 将孔内液体甩干, 加入去离子水 250 μL /孔, 充分洗涤 4~5 次, 每次间隔 10 s, 泼掉板孔内去离子水, 用吸水纸拍干 (拍干后未被清除的气泡可用未使用过的枪头戳破)。
9. **显色:** 加入底物液 A 液 50 μL /孔, 再加入底物液 B 液 50 μL /孔, 轻轻振荡混匀, 用盖板膜盖板后置 25 $^{\circ}\text{C}$ 避光环境中反应 10 min (见注意事项 7)。
10. **测定:** 加入终止液 50 μL /孔, 轻轻振荡混匀, 设定酶标仪于 450 nm 处 (建议用双波长 450/630 nm 检测, 请在 5 min 内读完数据), 测定每孔 OD 值。(若无酶标仪, 则不加终止液用目测法可进行判定)。

十、结果判定

结果判定有两种方法, 粗略判定可用第 1 种方法, 定量判定用第 2 种方法。注意样本吸光度值与其所含莱克多巴胺的含量成负相关。

1. 用样本的平均吸光度值与标准值比较即可得出其浓度范围 (ppb)。假设样本 1 的吸光度值为 0.458, 样本 2 的吸光度值为 0.858, 标准品吸光度值分别是: 0 ppb 为 1.753; 0.05 ppb 为 1.365; 0.15 ppb 为 1.007; 0.45 ppb 为 0.643; 1.35 ppb 为 0.334; 4.05 ppb 为 0.190。则样本 1 的浓度范围是 0.45~1.35 ppb 再乘以其对应的稀释倍数即可得出样本中莱克多巴胺残留的浓度范围; 样本 2 的浓度范围是 0.15~0.45 ppb 再乘以其对应的稀释倍数即可得出样本中莱克多巴胺残留的浓度范围。

2. 定量分析

(1) 百分吸光率的计算, 标准品或样本的百分吸光率等于标准品或样本的平均吸光度值 (双孔) 除以第一个标准品 (0 标准) 的平均吸光度值, 再乘以 100%, 即

$$\text{百分吸光率 (\%)} = \frac{B}{B_0} \times 100\%$$

B—标准品或样本溶液的平均吸光度值

B_0 —0 ppb 标准溶液的平均吸光度值

(2) 标准曲线的绘制与计算

以标准品百分吸光率为纵坐标, 以莱克多巴胺标准品浓度 (ppb) 的对数为横坐标, 绘制标准曲线图。将样本的百分吸光率代入标准曲线中, 从标准曲线上读出样本所对应的浓度, 乘以其对应的稀释倍数即为样本中莱克多巴胺的实

际浓度。

若利用试剂盒专业分析软件进行计算, 更便于大量样本的准确、快速分析。(欢迎来电索取)

样本稀释倍数

尿液样本稀释倍数: 1 倍

组织 (肌肉、肝脏) 样本稀释倍数: 6 倍

饲料样本稀释倍数: 50 倍

牛血清样本稀释倍数: 2 倍

十一、检测方法灵敏度、准确度、精密度

试剂盒灵敏度: 0.05 ppb

样本最低检测限:

尿液.....0.1 ppb

组织 (肌肉、肝脏) 0.3 ppb

饲料.....3 ppb

牛血清.....0.1 ppb

准确度:

尿液.....100% $\pm$ 20%

组织 (肌肉、肝脏) 95% $\pm$ 15%

饲料.....80% $\pm$ 15%

牛血清.....90% $\pm$ 20%

精密度:

试剂盒的板内、板间变异系数均小于 10%。

十二、注意事项

1. 室温低于 20 $^{\circ}\text{C}$ 或试剂及样本的温度没有回到室温 (20~25 $^{\circ}\text{C}$) 会导致 OD 值偏低, 影响检测结果。

2. 洗板后应立即进行下一步操作, 否则将出现标准曲线不成线性、重复性不好的现象。

3. 每加一种试剂前需要将其摇匀。

4. 使用超出有效期的试剂盒、掺杂使用不同批号试剂盒中的试剂, 都会导致产品灵敏度降低, 影响检测的准确性。

5. 储存条件

保存试剂盒于 2~8 $^{\circ}\text{C}$, 不要冷冻, 将不用的微孔板放回铝箔袋重新密封。标准品和底物液对光敏感, 应避免阳光直射。

6. 试剂变质的迹象

底物液有任何颜色表明底物液变质, 应当弃之。标准品 1 的吸光度值 (450/630 nm) 小于 0.5 ($A_{450\text{nm}} < 0.5$) 时, 表示试剂可能变质。

7. 在加入底物液 A 液和底物液 B 液后, 一般显色 10 min 即可。若颜色较浅, 可延长反应时间到 15 min (或更长), 但不得超过 20 min。反之, 则减短反应时间。

8. 该试剂盒最佳反应温度为 25 $^{\circ}\text{C}$, 温度过高或过低将导致

检测吸光度值和灵敏度发生变化，会直接影响检测结果。

十三、安全性说明

- 1.反应终止液为高浓度硫酸，避免接触皮肤。
- 2.操作过程中的酸类、碱类试剂和有机试剂，避免接触眼睛、口腔，如不慎入眼和误食，需立即使用清水冲洗和漱口，及时就医。
- 3.实验需匹配相应的实验设备和穿戴必需的实验装备(白服、手套、口罩等)。
- 4.实验中保持实验室整洁、空气流通。
- 5.实验废弃物单独收集，建议按照医疗废弃物处理。

十四、贮藏条件及有效期

贮藏条件：2~8℃保存。

有效期：12 个月。