

氯霉素检测试剂盒使用说明书

Kit Catalog No. BC-3001

一、概要:

氯霉素(Chloramphenicol)是一种广谱抗生素,对畜禽疾病控制和治疗有重要功效。但由于氯霉素存在严重的副作用,可抑制人体骨髓的造血功能,从而引起再生障碍性贫血,粒细胞缺乏等疾病,欧美等发达国家已相继禁止使用于动物饲料中。

本公司研发的氯霉素(Chloramphenicol)检测试剂盒是应用抗原,抗体特异性的免疫学原理而建立的一种敏感,特异,简便及快速的检测产品。主要应用于检测蜂蜜、蛋类、牛奶、奶粉、水产品、动物组织(肌肉、肝脏等)、饲料、血清、血浆及尿液样本中存在的氯霉素。

二、检测原理:

本试剂盒利用竞争酶联免疫方法,预先在微孔中包被羊抗兔抗体,实验时先后加入氯霉素标准品或待测样本,氯霉素酶标抗原和兔抗氯霉素抗体。经过室温温育,反应液中的兔抗氯霉素抗体与微孔板上的羊抗兔抗体结合,待测样品中的抗原与氯霉素酶标抗原竞争微孔板上的兔抗氯霉素抗体。洗涤后,没有与抗体结合的待测样品中的抗原或酶标抗原被洗去,再加入反应底物,结合的酶标抗原的酶将底物转化为蓝色产物,加入终止液后颜色由蓝色变为黄色。反应完成后,样品中氯霉素含量越多,反应呈色就越浅;反之,样品中氯霉素含量越少,则呈色越深。利用标准曲线可计算出样品中氯霉素含量。

三、试剂盒提供试剂:

1. 羊抗兔抗体包被的微孔板: 96 孔。
2. 氯霉素参考标准品: 0, 0.025, 0.05, 0.10, 0.25, 0.75 ppb (ng/ml); 1.5 ml/瓶 (黄

色), 一套共 6 瓶。

3. 氯霉素酶标抗原试剂 (1X): 7 ml/瓶。
4. 兔抗氯霉素抗体: 7 ml/瓶。
5. 样品稀释液: 100 ml/瓶。
6. 显色剂/底物: 11 ml/瓶。
7. 反应终止液: 11 ml/瓶。
8. 洗涤液(20X): 50 ml/瓶, 使用前稀释 20 倍。

四、实验需要但试剂盒不提供的试剂和仪器:

1. 试剂

- 乙酸乙酯
- 正己烷或正庚烷

2. 仪器

- 均质机 (Ultra-turrax)
- 微孔板酶标仪
- 振荡器
- 离心机
- 氮气吹干仪或旋转蒸发器
- 20 μ l, 50 μ l, 100 μ l, 200 μ l, 及 1 ml 移液器

五、待测样品处理方法:

1. 蜂蜜

- a) 称取 2 g 样品加入 4 ml 蒸馏水溶解均匀。
- b) 加入 4 ml 乙酸乙酯后,上下振荡 10 分钟。
- c) 在室温(18-25°C) 4,000 转,离心 10 分钟。
- d) 取上层清液(乙酸乙酯层) 1 ml, 60°C 蒸干(可使用氮气吹干仪或旋转蒸发器)。
- e) 于蒸干残留物中加入 500 μ l 样品稀释液混合,溶解。取溶液待测(相

氯霉素检测试剂盒使用说明书

Kit Catalog No. BC-3001

当于 1 g 样品/ml 检测液)。

2. 蛋类

- 称取 2 g 已匀浆全蛋(含蛋白和蛋黄), 加入 8 ml 乙酸乙酯, 搅拌均匀。
- 振荡 10 分钟, 然后在室温 (18-25°C) 4,000 转, 离心 10 分钟。
- 取上清液 1 ml, 移入另一玻璃管, 60°C 蒸干 (可使用氮气吹干仪或旋转蒸发器)。
- 于蒸干残留物中加入 250 μ l 样品稀释液混合, 溶解 (相当于 1 g 样品/ml)。并加入 1 ml 正己烷充分摇匀, 在室温 (18-25°C) 4,000 转, 离心 10 分钟, 取下层水相检测。
- 如果溶解后样品有乳化现象, 可将试管放入 80°C 水浴中 5 分钟, 然后在室温 (18-25°C) 4,000 转, 离心 5 分钟, 从试管底部吸取清亮水相待检测 (相当于 1 g 样品/ml 检测液)。

3. 牛奶/奶粉

- 取 6 ml 牛奶样品 (若为奶粉, 应先用蒸馏水按 1:6 稀释, 即 1g 奶粉溶于 6 ml 水中)。在 10°C 4,000 转, 离心 10 分钟, 吸除上层的脂肪。
- 取 4 ml 去除脂肪的牛奶于玻璃管中, 加入 8 ml 乙酸乙酯, 充分振荡混合 10 分钟, 在室温 (18-25°C) 4,000 转, 离心 10 分钟。(离心后可能会产生乳白色冻状物, 且乙酸乙酯液层较少, 可轻轻振荡使冻状物破碎, 再进行离心)。
- 取 4 ml 上层液 (相当于 2 ml 样品)

移入另一玻璃管, 并用 60°C 氮气流吹干。

- 于试管残留物中加入 200 μ l 样品稀释液充分摇匀, 在室温(18-25°C) 4,000 转, 离心 5 分钟, 取 100 μ l 清亮水相 (相当于 10 ml 牛奶样品/ml 检测液, 或是 1.67 g 奶粉/ml 检测液) 用于检测。

4. 生物组织 (鱼, 虾, 及肉类)

- 称取 2 g 剪碎的样品加入 8 ml 乙酸乙酯, 研磨或用匀浆器打碎。
- 振荡 10 分钟, 然后在室温(18-25°C) 4,000 转, 离心 10 分钟。
- 取上清液 1 ml (乙酸乙酯层), 60°C 蒸干 (可使用氮气吹干仪或者旋转蒸发器)。
- 于试管残留物中加入 1 ml 稀释液, 并加入 1 ml 正己烷, 充分摇匀, 在室温 (18-25°C) 4,000 转, 离心 10 分钟。离心后, 若下层液出现乳化现象, 应将试管放入 80°C 水浴中 5 min, 再进行离心。完全除去上层的正己烷, 从试管底部吸取 100 μ l 下层液 (相当于 0.25 g 样品/ml 检测液) 用于检测。

5. 饲料样品

- 取 2 g 粉碎过的饲料样品, 加入 8 ml 乙酸乙酯。
- 充分振荡混合 10 分钟, 然后在室温 (18-25°C) 4,000 转, 离心 10 分钟。
- 取 1 ml 上层清液(乙酸乙酯层), 60°C 氮气吹干。
- 于试管残留物中加入 1 ml 稀释液,

氯霉素检测试剂盒使用说明书

Kit Catalog No. BC-3001

并加入 1 ml 正己烷，充分摇匀，在室温 (18-25°C) 4,000 转，离心 10 分钟。离心后，若下层液出现乳化现象，应将试管放入 80°C 水浴中 5 分钟，再进行离心。完全除去上层的正己烷，从试管底部 (水相) 吸取 100 µl 下层液 (相当于 0.25 g 样品/ml 检测液) 用于检测。

6. 血清/血浆

- 取 1 ml 血清或血浆加入 2 ml 乙酸乙酯。
- 振荡 5 分钟，然后在室温 (18-25°C) 4,000 转，离心 10 分钟。
- 取 1 ml 上层清液 (乙酸乙酯层)，60°C 氮气吹干。
- 于蒸干残留物中加入 500 µl 样品稀释液混合，溶解 (相当于 1 ml 样品/ml 检测液)。取溶液待测。

7. 尿液

取尿液 1.0 ml，加入样品稀释液 1.0 ml，充分摇匀，在室温 (18-25°C) 4,000 转，离心 10 分钟。取 100 µl (相当于 0.5 ml 样品/ml 检测液) 上清液用于检测。

注：如样品中的氯霉素含量过高或过低，可在乙酸乙酯萃取后，调整所需蒸干的乙酸乙酯的量，以获得更准确的检测结果。

六、检测之前的注意事项及准备工作：

1. 注意事项：

- 使用前将所有试剂回升至室温 (18-25°C)。
- 严格按说明书操作，不得改变加样

顺序及温育时间。

- 尽量缩短加样时间，加入相同试剂或样品时应使用多道微量加样器。
- 洗板过程要小心操作，每个孔要均匀充满冲洗液。操作时应保持一致性和一定的强度，不可更改冲洗次数。
- 在读数之前用软纸轻轻擦试微孔板底部，防止因污染而影响读数结果。
- 洗涤后，避免微孔干燥。
- 在所有恒温孵育过程中，避免光线照射，可盖住微孔板。
- 没有用完的微孔板应存放在有干燥剂的密封袋内，2-8°C 保存。

2. 试剂准备：

• 实验前准备

将试剂盒取出放置于室温中，使试剂盒回温至室温 (18-25°C)。

• 20 倍稀释洗涤液准备

50 ml 浓缩洗涤液 (20X)，用蒸馏水或去离子水稀释至 1,000 ml。在 2~8°C 可保存三个月。用前混匀。

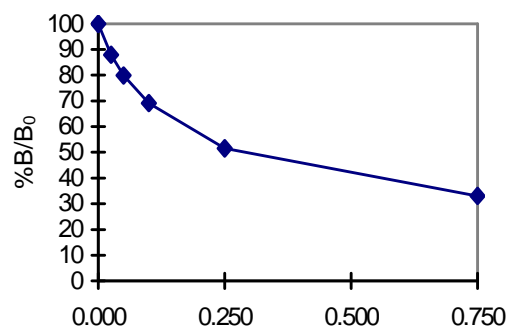
七、检测的操作步骤：

- 从密封袋中取出所需数目微孔板条放置在支架内，并编号。
- 加入氯霉素标准液 (浓度由低到高) 和待测样品，每孔 100 µl。
- 加入氯霉素酶标抗原，每孔 50 µl，轻轻摇匀 10 秒。
- 加入兔抗氯霉素抗体，每孔 50 µl，轻轻摇匀 30 秒。
- 置于室温反应 30 分钟 (18-25°C)。

氯霉素检测试剂盒使用说明书

Kit Catalog No. BC-3001

6. 弃去微孔中的反应液，用 300 μl / well 稀释好的洗涤液冲洗微孔，再重复洗 4 次，总共洗 5 次。
7. 将微孔中剩余液体在吸水纸上拍干。
8. 加入反应底物，每孔 100 μl ，轻轻摇匀 10 秒。
9. 置于室温反应 20 分钟 (18-25°C)，避免光线照射。
10. 加入反应终止液，每孔 100 μl ，轻轻摇匀 20 秒。
11. 在 15 分钟内，使用酶标仪在 450 nm 波长处读取各孔吸光度值，并绘制标准曲线。



氯霉素浓度 ppb (ng/ml)

八、结果分析:

1. 计算各标准品 (或样品) 的吸光度值百分比，按下式计算：

$$\%B/B_0 = \frac{\text{各标准品 (或样品) 平均吸光度值}}{\text{零标准品 (0 ng/ml) 的平均吸光度值}} \times 100$$

2. 绘制标准曲线图，纵坐标表示标准品百分比吸光值 (%B/B₀)，横坐标表示各标准品氯霉素浓度 ppb (ng/ml)。各样品浓度可根据其百分吸光度值，从标准曲线上读出，再乘以或除以样品的稀释倍数 (请参照第九项检测结果计算)。

氯霉素 ppb (ng/ml)	吸光度值	% B/B ₀
0.000	2.509	100.0
0.025	2.208	88.0
0.050	2.004	79.9
0.100	1.734	69.1
0.250	1.292	51.5
0.750	0.829	33.0

九、检测结果计算:

从标准曲线上读出样品中氯霉素的含量，并依据样品处理时稀释或浓缩倍数，按下表计算样品中氯霉素的实际浓度。

No.	样品	稀释系数	氯霉素的实际浓度 ppb, ng/ml, 或 ng/g
1	蜂蜜	1	校正曲线上读出的浓度值 x 1
2	蛋	1	校正曲线上读出的浓度值 x 1
3	牛奶	浓缩 10	校正曲线上读出的浓度值 ÷ 10
4	奶粉	浓缩 1.67	校正曲线上读出的浓度值 ÷ 10 x 6
5	虾, 鱼, 肉类, 及 内脏	4	校正曲线上读出的浓度值 x 4
6	饲料	4	校正曲线上读出的浓度值 x 4
7	血清/ 血浆	1	校正曲线上读出的浓度值 x 1
8	尿液	2	校正曲线上读出的浓度值 x 2

氯霉素检测试剂盒使用说明书

Kit Catalog No. BC-3001

十、最低检测灵敏度:

本氯霉素检测试剂盒的最低检测灵敏度为:
0.02 ppb (0.02 ng/ml, 0.02 ng/g).

十一、样品检测下限:

本试剂盒的最低检测灵敏度是 0.02 ppb (0.02 ng/ml 或 0.02 ng/g)。由于样品需要预先处理, 有其稀释度或浓缩度, 所以各样品必须依据其稀释度或浓缩度计算出其检测下限。

No.	样品	检测下限
1	蜂蜜	0.02 ppb (0.02 ng/g)
2	蛋类	0.02 ppb (0.02 ng/g)
3	牛奶	0.002 ppb (0.002 ng/ml)
4	奶粉	0.012 ppb (0.012 ng/g)
5	虾, 鱼及肉类	0.08 ppb (0.08 ng/g)
6	饲料	0.08 ppb (0.08 ng/g)
7	血清/血浆	0.02 ppb (0.02 ng/ml)
8	尿液	0.04 ppb (0.04 ng/ml)

十二、特异性:

- 交叉反应:
 - 氯霉素.....100%
 - 氯霉素碱.....0.4%
 - 甲基氯霉素.....≤0.04%
- 与四环素, 庆大霉素和氨基青霉素没有显现任何交叉反应。

十三、精密度:

CV% ≤ 10%

十四、添加回收实验的回收率:

No.	样品	回收率 (大约)
1	蜂蜜	70% ~ 110% 之间
2	牛奶	90% ~ 130% 之间
3	蛋, 虾, 鱼及肉类	95% ~ 120% 之间
4	饲料	95% ~ 120% 之间
5	血清 / 血浆	90% ~ 120% 之间
6	尿液	100% ~ 130% 之间

十五、文献:

- Cazemier, G. Haasnoot, W. and Stouten, P. Screening of chloramphenicol in urine, tissue, milk and eggs in consequence of the prohibitive regulation. Proceedings Euroresidue III 1996, Eds. N. Haagsma and A. Ruiter, Page 315

Version 070909