

## 克伦特罗检测试剂盒使用说明书

Kit Catalog No. BC-3003

### 一、概要:

克伦特罗(Clenbuterol), 俗称瘦肉精, 是一种  $\beta_2$  兴奋剂。能提高动物体内的瘦肉的比例, 并加速动物生长, 而被广泛添加于动物饲料中, 然而其会残留在动物体内, 人类食用后会产生严重的副作用, 轻则导致心跳及心率不正常, 重则可引发心脏病。目前, 许多国家政府已明令禁止其使用于动物饲料中。

本公司研发生产的克伦特罗检测试剂盒的检测结果准确、稳定, 可检测存在于动物的尿液、血清、血浆、组织 (肌肉、心脏、肝脏等)、及动物饲料样本中的克伦特罗。样品前处理方式简单、方便, 适用于各级政府食品安全检测机构、各类屠宰企业、肉类食品加工及饲料生产企业等。

### 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, 实验时先后加入克伦特罗标准品, 或待测样本, 克伦特罗酶标抗原和兔抗克伦特罗抗体。经过室温温育, 反应液中的兔抗克伦特罗抗体与微孔板上的羊抗兔抗体结合, 待测样品中的克伦特罗与克伦特罗酶标抗原竞争微孔板上的兔抗克伦特罗抗体。洗涤后, 没有与抗体结合的待测样品中的克伦特罗或酶标抗原被洗去, 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, 样品中克伦特罗含量越多, 反应呈色就越浅; 反之, 样品中克伦

特罗含量越少, 则呈色越深。利用标准曲线可计算出样品中克伦特罗含量。

### 三、试剂盒提供试剂:

1. 羊抗兔抗体包被的微孔板: 96 孔。
2. 克伦特罗参考标准品: 0, 0.05, 0.25, 1.00, 2.50, 5.00 ppb (ng/ml); 1.5 ml/瓶, 一套共 6 瓶。
3. 克伦特罗酶标抗原试剂 (1X): 7 ml/瓶。
4. 兔抗克伦特罗抗体: 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、其它试剂和仪器:

#### 1. 试剂

- 盐酸 (5 mM, 10 mM)
- 氢氧化钠溶液 (2.0 M)

#### 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
- 超声波破碎仪
- 20  $\mu$ l, 50  $\mu$ l, 100  $\mu$ l, 200  $\mu$ l, 及 1 ml 移液器

### 五、待测样品处理方法:

#### 1. 尿液

将样品在室温 (18-25°C) 以 4,000 转离心 10 分钟后取上清液或者过滤后取滤液 100

## 克伦特罗检测试剂盒使用说明书

Kit Catalog No. BC-3003

$\mu\text{l}$ , 加入样品稀释液 400  $\mu\text{l}$  (5 倍稀释), 用于下一步检测。如预计样品中克伦特罗含量较低, 也可加入样品稀释液 100  $\mu\text{l}$  (2 倍稀释)。

### 2. 血清/血浆

a) **血清:** 抽取动物血液, 置于玻璃试管中待其凝固, 在室温 (18-25°C) 以 4,000 转离心 10 分钟后取上层清亮液体 (血清), 如血块无明显收缩, 导致血清量不足, 可用竹签轻轻拨动血块后再离心, 取上清液 100  $\mu\text{l}$ , 加入样品稀释液 400  $\mu\text{l}$  (5 倍稀释) 均匀混合, 取 100  $\mu\text{l}$  溶液, 用于下一步检测。

b) **血浆:** 取 100  $\mu\text{l}$  血浆, 加入样品稀释液 400  $\mu\text{l}$  (5 倍稀释) 均匀混合, 用于下一步检测。

**注:** 取血过程中尽量避免溶血, 如血清混浊, 可离心取上清液检测。

### 3. 肉样及内脏组织

- 用均质机(Ultra-turrax) 对组织样品进行均质。
- 称取 1 克均质后的组织样品到离心管中, 加入 1 ml 10 mM 的盐酸, 涡旋振荡 2 分钟。
- 将混匀后的样品以在室温 (18-25°C) 以 10,000 转离心 5 分钟或以 4,000 转离心 10 分钟, 吸取 250  $\mu\text{l}$  上清液到 1.5 ml 试管中。
- 加入 5  $\mu\text{l}$  的 2M 氢氧化钠溶液, 均匀混合。
- 将以上样品再次在室温 (18-25°C) 以

10,000 转离心 5 分钟或者以 4,000 转离心 10 分钟, 直接吸取上清液 100  $\mu\text{l}$ , 加入样品稀释液 400  $\mu\text{l}$  (5 倍稀释), 均匀混合, 用于下一步检测。

### 4. 肉动物饲料

- 称取 5.0 克的饲料样品, 加入 10 ml 5 mM 的盐酸, 置于离心管中涡旋振荡混匀 30 分钟或超声混匀 20 分钟。在室温 (18-25°C) 以 4,000 转离心 10 分钟, 转移出上清液, 吸取上清液 100  $\mu\text{l}$ , 加入样品稀释液 100  $\mu\text{l}$ , 均匀混合, (相当于 0.25g 样品/ml 检测液) 用于下一步检测。

## 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。

## 克伦特罗检测试剂盒使用说明书

Kit Catalog No. BC-3003

- 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、操作步骤:

1. 从密封袋中取出所需数目微孔板条放置在支架内, 并编号。
2. 加入克伦特罗标准液 (浓度由低到高) 和待测样品, 每孔 100  $\mu$ l。
3. 加入克伦特罗酶标抗原, 每孔 50  $\mu$ l, 轻轻摇匀 10 秒。
4. 加入兔抗克伦特罗抗体, 每孔 50  $\mu$ l, 轻轻摇匀 30 秒。
5. 置于室温反应 30 分钟 (18-25°C)。
6. 弃去微孔中的反应液, 用 300  $\mu$ l / 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  $\mu$ l, 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  $\mu$ l, 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。

线。

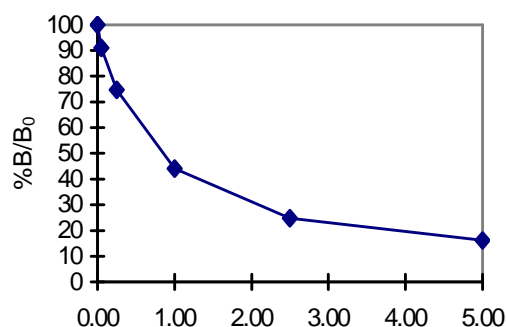
### 八、结果分析:

1. 计算各标准品 (或样品) 的吸光度值百分比, 按下式计算:

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

2. 绘制标准曲线图, 纵坐标表示标准品百分比吸光值 (%B/B<sub>0</sub>), 横坐标表示各标准品克伦特罗浓度 ppb (ng/ml)。各样品浓度可根据其百分比吸光度值, 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)。

克伦特罗 ppb (ng/ml)	吸光度值	% B/B <sub>0</sub>
0.00	2.584	100.0
0.05	2.351	91.0
0.25	1.934	74.8
1.00	1.136	44.0
2.50	0.641	24.8
5.00	0.415	16.1



克伦特罗浓度 ppb (ng/ml)

## 克伦特罗检测试剂盒使用说明书

Kit Catalog No. BC-3003

### 九、检测结果计算:

按以上所述进行样品处理, 并从标准曲线上读出的浓度值, 须按下表计算克伦特罗的实际浓度。

No.	样品	稀释系数	氯霉素的实际浓度 ppb, ng/ml, 或 ng/g
1	尿液	2 或 5	校正曲线上读出的浓度值 x 2 或 5
2	血清/ 血浆	5	校正曲线上读出的浓度值 x 5
3	肉类/ 内脏	5	校正曲线上读出的浓度值 x 5
4	饲料	4	校正曲线上读出的浓度值 x 4

### 十、最低检测灵敏度:

本克伦特罗检测试剂盒的最低检测灵敏度为: 0.05 ppb (0.05 ng/ml, 0.05 ng/g)。

### 十一、样品检测下限:

本试剂盒的最低检测灵敏度是 0.05 ppb (0.05 ng/ml 或 0.05 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	尿液(2 倍稀释)	0.10 ppb (0.10 ng/ml)
2	尿液(5 倍稀释)	0.25 ppb (0.25 ng/ml)
3	血清/血浆	0.25 ppb (0.25 ng/ml)
4	肉类及内脏	0.25 ppb (0.25 ng/g)
5	饲料	0.20 ppb (0.20 ng/g)

### 十二、交叉反应(特异性):

- 克伦特罗.....100%
- 沙丁胺醇.....143%

### 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	尿样	70% ~ 110% 之间
2	血清/血浆	85% ~ 105% 之间
3	肉类	85% ~ 105% 之间
4	肝/心脏	80% ~ 110% 之间
5	饲料	75% ~ 115% 之间

### 十五、文献:

1. Haasnoot, W., Cazemier, G., Stouten, P. and Kemmers-Voncken, A. Immunochemical Approaches to the Analysis of  $\beta$ -Agonistic Drugs. ACS-Books, Residue Analysis in Food Safety: Applications of Immunoassay Methods. Eds. Ross. C. Beier and Larry H. Stanker (1996).
2. Haasnoot, W., Stouten, P., Schilt, R., Hooijerink, D. A fast immunoassay for the screening of  $\beta$ -agonists in hair. Analyst 123, (1998), 2707.