

四环素检测试剂盒（蜂蜜）使用说明书

适用

Beacon 四环素检测试剂盒是利用竞争酶联免疫吸附测定法用于食品中的四环素的定量检测。

检测原理

竞争酶联免疫吸附测定法定量测定四环素残留（普天酶标仪检测四环素）。利用萃取液通过混合及振荡的方式提取样品中的四环素，再用缓冲液稀释，然后进行免疫测定。先将标准及样品加入到微孔中，再加入抗体进行反应。孵育 30 分钟后洗掉小孔中所有没有结合的分子。每孔中加入酶标记物，再孵育 30 分钟后洗掉小孔中所有没有结合的分子。每孔中加入干净的底物溶液，结合的酶标记物将无色的发色剂转化为蓝色的物质。孵育 30 分钟后停止此反应，根据各孔颜色深浅进行数据读取。依据标准的颜色得出样品的浓度值。

试剂盒组成

1. 真空包装微孔板（12×8 条）
2. 6 瓶浓缩标准液，2ml/瓶，为四环素溶液 0ppb，
0.4ppb，1.2ppb，3.6ppb，10.8ppb，32.4ppb
(1:10 稀释之后使用，浓度分别为 0ppb，0.04ppb，0.12ppb，0.36ppb，1.08ppb，3.24ppb)
3. 22ml 酶标记物一瓶
4. 12ml 四环素抗体一瓶
5. 14ml 底物一瓶
6. 14ml 停止液一瓶（注意！1N 盐酸，小心处理）
7. 说明书

注意事项

1. 最好配套使用 Beacon 所提供的试剂，不要同其它公司的产品混用，不要将不同批次的产品混用。
2. 样品稀释或含有杂质很可能对结果的准确性有影响。
3. 不要使用过期的产品。
4. 使用之前将所有试剂回升至室温 20-28°C，但不要放置超过 24 小时。
5. 四环素属于抗生素，请小心处理。
6. 停止液是 1N 盐酸，避免接触皮肤。

需要设备

普天酶标仪（型号：PT-3502）

量筒（100ml）

蒸馏水或去离子水

振荡器

超声波浴槽

洗瓶

计时器

吸水纸或相当的吸水材料

可吸取 50μl 的移液器及吸头

可吸取 50μl 和 100μl 的八道移液器及吸头

20mM PBS: PH7.4 (0.62g NaH₂PO₄-2H₂O+5.73gNaHPO₄-12H₂O+9gNaCl)/L 蒸馏水定容至 1000ml，调节 PH 到 7.4

标准液准备

试剂盒中所配标准为 10 倍浓缩的,在使用前需先用 20mMPBS 稀释。例如:取 100ul 0.4ppb 标准液于 900ul 20mMPBS 中得到 0.04ppb 的工作标准;其它标准也按此法稀释使用。

样品处理程序

1. 称取 1 g 蜂蜜样品于带盖玻璃瓶中(60—80ml)。
2. 加入 49ml 20mMPBS。(1ml 样品加入 49ml 提取液,相当于 1:50 稀释)
3. 入样品瓶于超声波浴槽中超声 5 分钟。
4. 剧烈振荡 2 分钟。
5. 颠倒样品瓶混合数次,取 100ul 分析。

检测程序

1. 所有试剂及样品置于室温下。将清洗液稀释 10 倍备用。
2. 从铝箔袋中拿出要求数量的微孔条,放入干燥剂并重新封好袋子以免微孔条受潮。
3. 吸取 100ul 标准、样品到微孔板的每个孔中。必须保证每种溶液使用干净的吸头吸取,避免交叉污染。
4. 吸取 100ul 抗体溶液到对应微孔中,震荡 30 秒,孵育 30 分钟。
5. 孵育完后,将微孔中的溶液倒入水槽中,用 1 倍清洗液清洗完全充满微孔,震荡后倒掉,重复三次,总共四次洗板。在吸水纸上拍打,尽可能将水拍干。
6. 加入 200ul 酶标记物于各微孔中。
7. 孵育 30 分钟。
8. 重复步骤 5。
9. 每个微孔中加入 100ul 底物溶液。
10. 孵育 30 分钟。
11. 按照加底物的顺序每孔中加入 100ul 停止液。
12. 450nm 下读板。

结果分析

1. 半定量的结果是由样品的吸光率与标准的吸光率的简单对比而来判定:样品的颜色比标准的颜色浅则四环素的浓度比标准样的浓度高,样品的颜色比标准的颜色深则四环素的浓度比标准样的浓度低。
2. 定量分析需要绘制以标准样的吸光率为 X 轴,以标准样的浓度的半对数为 Y 轴的曲线图。依据标准样吸光率的点画成一直线,如此样品的光吸收率可在线上找到,与此相对应的 Y 轴则为样品的浓度,样品光吸收率范围应比标准样的最底范围高,比最高范围低,即可说明此样品中四环素的含量大于 3.24ppb 或小于 0.04ppb。