

## 呋喃唑酮检测试剂盒使用说明书

适用

Beacon AOZ (3-氨基-2-恶唑烷酮) 检测试剂盒是利用酶联免疫吸附测定法用于食品中呋喃唑酮的稳定代谢物 AOZ (3-氨基-2-恶唑烷酮) 的定量测定。

### 检测原理

酶联免疫吸附测定法定量测定 AOZ (3-氨基-2-恶唑烷酮) 残留(普天酶标仪检测硝基呋喃)。利用萃取液通过均质及振荡的方式提取样品中的 AOZ (3-氨基-2-恶唑烷酮)，萃取物将和 2-硝基苯甲醛衍生成 NP-AOZ。然后进行免疫测定。先将酶标记物加入到混合孔中，再向混合孔中加入标准及样品。然后将混合好的酶标记物与标准品或样品的混合物转移到包被有抗体的测试孔样品中，在 30 分钟的孵育时间里，样品中的 AOZ (3-氨基-2-恶唑烷酮) 和酶标记物相互竞争与抗体结合。30 分钟后洗掉小孔中所有没有结合的分子。每孔中加入清澈的底物溶液，结合的酶标记物将无色的底物转化为蓝色的物质。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。

### 特异性

以下表格中 NP-AOZ 的交叉反映率 (%CR)。

种类 % CR

NP-AOZ 100%

NP-AMOZ < 1%

NP-AHD < 1%

NP-SCA < 1%

\*\* AMOZ 为呋喃唑酮代谢物；AHD 为呋喃西林代谢物 1-氨基海因盐酸盐；SCA 为氨基脲

### 检测限

水产品: 0.1ppb

### 提供试剂及材料

试剂盒在 2-8℃ 贮存 (不要冷冻)，于盒上标注日期前用完

⌘ 包被有抗体的真空包装微孔板 (12×8 条)

⌘ 6 瓶 NP-AOZ 标准液，每瓶 2 mL 浓度分别为 0,10,30,90, 270,540 ng/L (ppt) .

⌘ 1 瓶 12 mL AOZ 酶标记物

⌘ 1 瓶 14 mL 底物

⌘ 1 瓶 14 mL 停止液. (注意! 1N 盐酸. 勿接触皮肤.)

⌘ 混合孔

⌘ 1 瓶样品衍生化试剂

⌘ 1 瓶样品萃取液

⌘ 操作说明书

### 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 (62-82°F)，但不要放置超过 24 小时。
5. AOZ (3-氨基-2-恶唑烷酮) 属于抗生素，请小心处理。

6. 停止液是 1N 盐酸, 避免接触皮肤。如有溢出请立即用大量的清水冲洗。另外如不慎接触也应立即用大量清水冲洗。

试剂盒未提供的材料

1. 实验室品质的蒸馏水或去离子水
2. 样品萃取及收集用的玻璃器皿
3. 可吸取 100ul 的移液器及吸头
4. 可吸取 100ul 和 150ul 的八道移液器及吸头
5. 吸水纸或相当的吸水材料
6. 450nm 的普天酶标仪 PT-3502
7. 计时器
8. 均质机
9. 洗瓶
10. 1M 盐酸
11. 1M 氢氧化钠
12. 0.1M 磷酸氢二钾
13. 乙酸乙酯
14. 正己烷

样品制备

肉类样品(1:2 稀释)

1. 将样品均质
2. 称 1 g 均质后样品并加入 4ml 去离子水, 0.5mL1M 盐酸, 100ul 样品衍生化试剂, 并充分混合 3 分钟。
3. 37℃条件下孵育大约 16 小时 (或 50℃孵育 3 小时)。
4. 加 5mL0.1M 磷酸氢二钾, 0.4 mL1M 氢氧化钠, 6 mL 乙酸乙酯, 充分混合 1 分钟。
5. 3000 g 室温离心 5 分钟。
6. 移取乙酸乙酯上层溶液 3ml 于另一试管中蒸干。
7. 加入 1ml 正己烷 (或庚烷) (如脂肪含量高的样品可加入 2ml 正己烷) 适当混合后加入 0.5ml 样品萃取液。
8. 3000 g 室温离心 5 分钟。
9. 去除上层有机相。(必须彻底除去正己烷, 否则容易造成假阳性。提示: 除去上层后室温放置一小时以上再测定较好。)
10. 取下层 100ul 于干净试管中, 加入 100ul 样品稀释液, 测定。

备注: 因呋喃类 (AOZ, AMOZ, SEM,AHD 四种试剂盒前处理合并到一起做, 所以更改 AOZ 稀释倍数)

免疫测定过程 (注意: 标准及样品最好做平行试验以增加准确度)。1. 将所有试剂及样品置于室温下。

2. 从铝箔袋中拿出要求数量的混合孔条和测试孔条, 放入干燥剂并重新封好袋子以免孔条受潮。
3. 吸取 100ul 标准、样品到对应混合孔中, 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 酶标记物到混合孔板的每个孔中, 轻轻地混合至少 30 秒。
5. 从混合孔中吸取 150ul 混合溶液到相应的测试孔中, 轻轻地混合至少 30 秒。
6. 室温下孵育测试孔 30 分钟。
7. 孵育完后, 将测试孔中的溶液倒入水槽中, 用蒸馏水完全充满微孔, 震荡后倒掉, 重复三次, 总共四次洗板。

8. 最后一次清洗完后, 倒掉孔中溶液, 然后翻转测试孔板在吸水纸上拍干。
9. 每个测试孔中加入 100ul 底物溶液。
10. 室温下孵育 30 分钟。
11. 在每个孔中加 100ul 停止液。
12. 450nm 下读取吸光度值。

#### 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 AOZ (3-氨基-2-恶唑烷酮) 的浓度比标准样的浓度高, 样品的颜色比标准的颜色深则 AOZ (3-氨基-2-恶唑烷酮) 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最低标准的范围高,比最高标准的范围低, 即可说明此样品中 AOZ (3-氨基-2-恶唑烷酮) 的含量大于 4.05ppb 或小于 0.05ppb。