mlbio

诺氟沙星(NFLX)ELISA定量检测试剂盒说明书

Catalog Number：ml103609

产品仅供教研使用

用于定量检测肉/鱼/虾、蛋奶样本中的诺氟沙星的含量。

使用本产品之前，必须完整阅读本说明书，仅供科研使用。

For research use only. Not for use in industrial procedures.

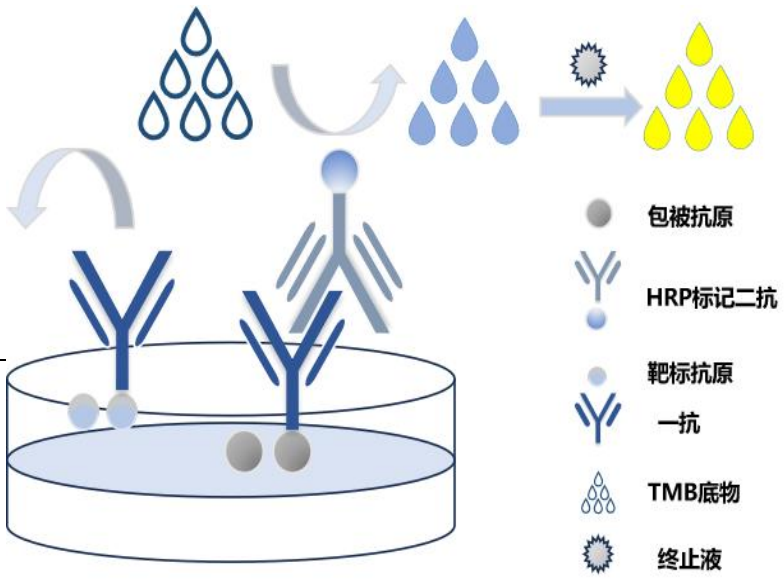
简介

诺氟沙星（Norfloxacin）为第三代喹诺酮类抗菌药，具有抗菌谱广、作用强的特点，对铜绿假单胞菌、大肠杆菌等革兰阴性菌有较强的杀菌作用。诺氟沙星对肺炎链球菌和厌氧菌几乎不具备抗菌活性，因此，其通常不用于治疗呼吸道感染。目前，诺氟沙星主要用于敏感菌所致泌尿道、肠道感染，淋病，伤寒及其他沙门菌感染。通过阻碍致病细菌的 DNA 旋转酶（DNA Gyrase）的作用，阻碍细菌 DNA 复制，对细菌有抑制作用。但此药对未成年人骨骼形成有延缓作用，会影响到发育，故禁止未成年人服用。

本酶联免疫检测试剂盒可以经济、快速地检测肉/鱼/虾、蛋奶等样品中诺氟沙星的残留量。

检测原理

本试剂盒采用间接竞争ELISA方法，在酶标板微孔条上预包被偶联抗原，样本中诺氟沙星和微孔条上预包被的偶联抗原竞争诺氟沙星抗体，加入酶标二抗后，形成包被抗原-抗体-酶标二抗复合物。随后结合的酶催化TMB底物显色，样本吸光值与其含有的诺氟沙星成负相关，与标准曲线比较再乘以其对应的稀释倍数，即可得出样品中诺氟沙星的含量。



间接竞争法模式图

按操作顺序形成包被抗原-抗体-酶标二抗复合物后，加入 TMB 底物，板孔液体由无色

procedures.

变成蓝色，再加入终止液液体变为黄色后进行吸光度值测定。

检测实验的局限性

仅供科研使用。

试剂盒的使用期限不得超过试剂盒标签上的有效期。不要将试剂与其他批次或来源的试剂混合使用或替换使用。

如果样品产生的值高于最高标准，则用测定稀释剂进一步稀释样品，并重复测定。稀释剂、操作人员、移液技术、洗涤技术、培养时间或温度以及试剂盒使用年限的任何变化都可能导致结合变化。

样本采集、处理和存储的变化可能会导致样本值的差异。

本试剂盒实验设计消除了不同样品中可能潜在的干扰因素的影响，但并不能涵盖所有潜在影响因素。不能排除存在其他干扰的可能性。

操作要点

为了避免交叉污染，在添加每个标准品、样品和试剂时应更换移液器枪头。

当使用自动洗板机时，在加入洗涤缓冲液后加入30秒的浸泡期，或者在洗涤步骤之间将板旋转180度，可以提高测定精度。

显色剂应保持无色，直到添加到板中。确保显色剂不受光线照射。

应按照与显色剂相同的顺序将终止液添加到板中。加入终止液后，孔中形

For research use only. Not for use in industrial procedures.

成的颜色将从蓝色变为黄色。蓝色的孔表示终止液未与溶液充分混合。

试剂盒组成及储存条件

名 称	规格（48T）	规格（96T）	储存条件
预包被酶标板	8×6 条	8×12 条	剩余置于 2-8℃储存至多 1 个月
标准品	1 支×100μL	1 支×200μL	剩余置于-20℃储存至多 6 个月
100×一抗试剂	1 支×50μL	1 支×100μL	剩余置于-20℃储存至多 6 个月
100×酶标抗体	1 支×50μL	1 支×100μL	
20×浓缩稀释液	1 支×15mL	1 支×25mL	置于 2-8℃可保存至有效期末
显色剂 A	1 支×3mL	1 支×6mL	
显色剂 B	1 支×3mL	1 支×6mL	
终止液	1 支×3mL	1 支×6mL	
20×浓缩洗涤液	1 支×15mL	1 支×25mL	
封板膜	2 张	2 张	
产品说明书	1 份	1 份	

需要的其他材料

- 酶标仪，450nm/630nm
- 移液器及枪头；
- 蒸馏水或去离子水
- 100-1000 mL刻度量筒。
- 洗瓶、排枪或自动微孔板清洗机。

For research use only. Not for use in industrial procedures.

- 恒温培养箱
- 振荡器
- 天平（感量0.01g）
- 用于稀释标准品和样品的试管。
- 50mL离心管

注意事项

此试剂盒提供的终止液为稀硫酸溶液，具有一定腐蚀性，应谨慎操作。

该试剂盒中的某些成分含有防腐剂，可能会引起皮肤过敏反应，应佩带口罩避免吸入薄雾。

显色剂B可能会引起皮肤、眼睛和呼吸道刺激，应佩带口罩避免吸入薄雾。

佩戴防护手套、防护服、眼睛和面部防护用品。处理后彻底洗手。

样品预处理

样本前处理需配液：

1. 0.15M 浓盐酸：取 5mL 浓盐酸，用去离子水定容至 400mL。

2. PBS 缓冲液：称取 8.5g 氯化钠，1.15g 磷酸氢二钠，0.27g 磷酸二氢钠，用去离子水定容至 1L。

3. 样本提取液：量取 10mL 0.15M 盐酸溶液加入到 90mL 无水乙腈中混合均匀。

下面列出的样品收集和储存条件旨在作为一般性指导。样品稳定性尚未评估。

1. 组织样本处理方法：

For research use only. Not for use in industrial procedures.

(1) 称取 2.0±0.05g 均质样本，精确到 0.1g，置于 50mL 离心管中，加入 8mL 样本提取液振荡 5min；

(2) 4000r/min 离心 10min；

(3) 取出 2mL 上清液于试管中，60℃氮吹吹干；

(4) 再加入 1mL 正己烷，振荡 2min，再加入 1mL PBS 溶液，振荡 30s，4000r/min 离心 5min；

(5) 取下层 50μL 进行检测。

样品稀释倍数：2 倍

2. 蜂蜜样本处理方法：

(1) 称取 1.0±0.05g 均质样本，精确到 0.1g，置于 50mL 离心管中，加入 6mL 样本提取液振荡 5min；使其充分溶解；

(2) 加入 3mL PBS 溶液，加入 11mL 二氯甲烷，振荡 5min，4000r/min 离心 5min；

(3) 取下层有机相 8mL 于试管中，60℃氮吹吹干；

(4) 用 1mL PBS 溶液溶解，再加入 1mL 正己烷混合 30s，3000r/min 离心 5min；

(5) 取下层 50μL 进行检测。

样品稀释倍数：2 倍

3. 牛奶样本处理方法：

(1) 取 25μL 牛奶样本与 475μL PBS 溶液进行混合，振荡 1min，使其充分溶解；

(2) 取 50μL 进行检测。

样品稀释倍数：20 倍

For research use only. Not for use in industrial procedures.

4. 鸡蛋样本处理方法：

(1) 称取 1.0±0.02g 均质物至 10ml 聚苯乙烯离心管中，加入 5ml 去离子水，振荡，使其充分溶解；

(2) 取 100μl 样本液与 400μl PBS 溶液混合，振荡 1 分钟；

(3) 取 50μL 进行检测。

样品稀释倍数：30 倍

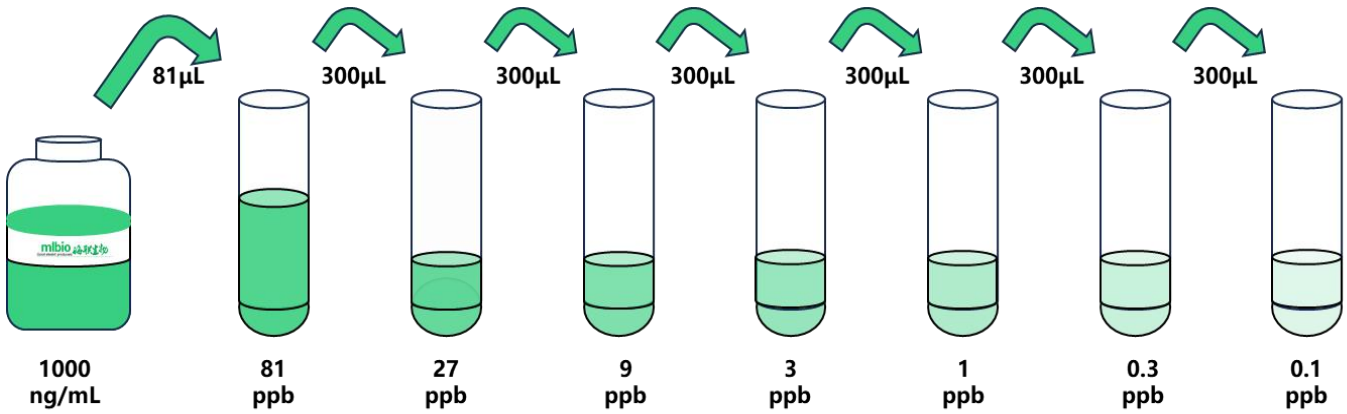
试剂准备

使用前将所有试剂置于室温平衡30分钟左右。

洗涤液/稀释液配制：如果洗涤液/稀释液（20×）有晶体析出，需在37°C下加热至晶体全部溶解。用蒸馏水1:20稀释 (例如：1mL 浓缩洗涤液加入19mL的蒸馏水)

标准品配制：试剂盒中取出标准品，准备7个试管，先将1000ppb标准品（200μL）按需吸取一定量用1×稀释液稀释至81ppb（例：81μL的标准品母液+919μL的1×稀释液，制备得到1000μL的81ppb浓度标准品），随后在6个试管中分别加入600μL的1×稀释液，在这6个单独的试管中81ppb标准品依次3倍倍比稀释至6个梯度，共配制7个浓度的标准品，依次为：81ppb、27ppb、9ppb、3ppb、1ppb、0.3ppb、0.1ppb，从最高浓度标准品溶液中吸取300μL标准品到下一个试管中，轻轻吹打混匀，以此类推进行标准品的倍比稀释（如图所示），1×稀释液用作零浓度标准品(0ppb)。

For research use only. Not for use in industrial procedures.



一抗工作液配制：使用前10分钟，用1×稀释液将100×一抗工作液稀释成1×一抗工作液，根据所需用量配置。

酶标二抗工作液配制：使用前10分钟，用1×稀释液将100×酶标二抗稀释成1×酶标抗体工作液，根据所需用量配置。

备注：如样本中待测物浓度高于标准品最高值，请根据实际情况选择适当的稀释倍数（建议：将待测样本用样品稀释液最低稀释1倍，在正式实验之前做预实验，以确定具体稀释倍数）；标准品母液及100×酶标二抗溶液根据实验所需酶标板孔数吸取一定量配制工作液，剩余溶液应放回-20℃储存，且避免反复冻融。（若实验在1-2周内做完，标准品母液及100×酶标抗体置于2-8℃保存；若实验为长时间跨度实验，建议将标准品母液及100×酶标抗体置于-20℃保存，以保证实验结果的稳定性）

实验步骤

所有标准品、样品建议复孔检测

1. **样本孵育：**每孔分别加入 50μL 不同浓度的标准品/预处理过的待测样品，

For research use only. Not for use in industrial procedures.

同时加入抗试剂 50μL/孔（加抗试剂时请使用多道移液器），盖上封板膜在 37℃下孵育 30 分钟。孵育结束后，重复步骤 1 中的清洗步骤 3 次。

2. **二抗孵育：**每孔加入 100μL 酶标抗体工作液，轻轻混匀，盖上封板膜在 37℃下避光孵育 30 分钟。孵育结束后，重复步骤 1 中的清洗步骤 4 次。
3. **底物显色：**每孔首先加入 50μL 显色液 A，随后加入 50μL 显色液 B，轻轻混匀，盖上封板膜在 37℃下避光孵育 15 分钟。(加显色液时请使用多道移液器，根据样品和对照抗体的颜色，自行控制显色时间)
4. **终止反应：**待显色反应结束后，每孔加入 50μL 终止液（加终止液时请使用多道移液器），轻轻混匀，5 分钟内用预热完成的酶标仪在 450nm 处测吸光值。

实验步骤汇总

1. 加标准品/样品和一抗，37℃反应 30 分钟，洗涤 3 次。
2. 加酶标二抗，37℃反应 30 分钟，洗涤 4 次。
3. 加显色液，37℃避光反应 15 分钟。
4. 加终止液，在 5 分钟内读数。

结果的计算

以浓度的对数为横坐标，OD 值为纵坐标，绘出四参数逻辑函数的标准曲线。或者使用能够生成四参数逻辑（4-P）曲线拟合的计算机软件来创建标准曲线。

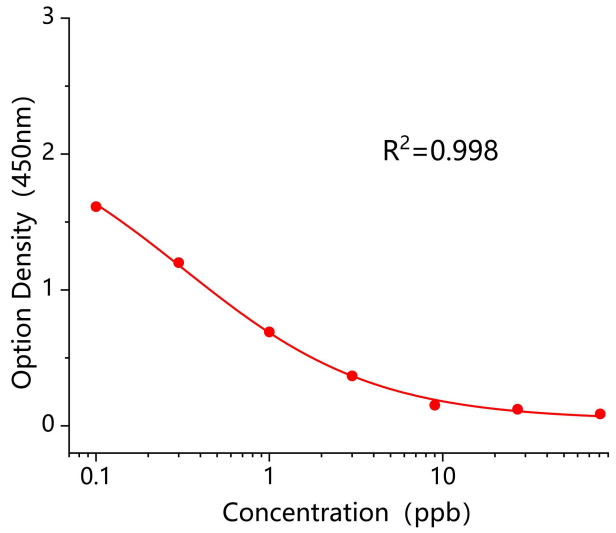
若样品 OD 值高于标准曲线上限，应适当稀释后重测并在计算样本浓度时乘以相应的稀释倍数。

For research use only. Not for use in industrial procedures.

示例数据

以下数据和曲线仅供参考，实验者需根据自己的实验数据建立标准曲线。

标准品浓度 (ppb)	81	27	9	3	1	0.3	0.1	0.0
校正 OD 值	0.088	0.122	0.152	0.368	0.691	1.201	1.613	2.271



本图所示标准曲线仅供示例，结果计算应以同次试验标准品所绘标准曲线为准计算样本结果。

精密度

批内精密度：三组已知的高、中、低浓度样品，进行二十次在同一个板块内精度评估。

批内变异系数 CV%小于10%。

批间精密度：三组已知的高、中、低浓度样品，进行二十次在不同板块内精度评估。

批间变异系数 CV%小于15%。

回收率

For research use only. Not for use in industrial procedures.

样本回收率：80%-120%

灵敏度

经样本测试，本试剂盒的检测灵敏度为0.1 ppb。

线性关系

校准品剂量反应曲线相关系数 r 值，大于等于 0.998。

交叉反应性

诺氟沙星：100%

For research use only. Not for use in industrial procedures.

ELISA Plate Template	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12
A												
B												
C												
D												
E												
F												
G												
H												

For research use only. Not for use in industrial procedures.