

卡那霉素残留ELISA检测试剂盒

Cat: AC72829

Content: 96 Tests

Storage: 2°C-8°C

For research use only

目录

CONTENT

产品介绍.....	01
检测原理.....	01
试剂盒提供的材料.....	02
试剂盒未提供的材料与设备.....	02
储存条件及有效期.....	03
注意事项.....	03
试剂配制.....	03
操作流程.....	05
流程总结.....	05
数据处理.....	06
产品数据展示.....	06

产品介绍

卡那霉素 (Kanamycin) 是一种氨基糖苷类抗生素, 其工作原理是与细菌的 30S核糖体亚基结合, 导致t-RNA的误读, 使细菌无法合成对其生长至关重要的蛋白质, 被广泛地用于生物医药、动物疾病治疗和食品行业。由于卡那霉素在体内不代谢, 生物制品中卡那霉素残留对人体具有严重危害, 其会导致不同程度的耳毒性、肾毒性以及神经毒性等作用。因此, 我国及欧美均对卡那霉素在生物制品和动物性食品中的使用和残留检测制定了规范。艾策生物的卡那霉素残留ELISA检测试剂盒 (AC72829) 提供了一种快速、灵敏和可重复的方法测定样品中卡那霉素的残留, 适用于基因和细胞治疗质粒放行以及相关生物制品中卡那霉素的残留检测。

检测原理

卡那霉素残留ELISA检测试剂盒原理是采用间接竞争一步法。在酶标板中加入标准品 (或样品)、卡那霉素抗体和酶标二抗, 微孔板上预包被的抗原与加入的标准品 (或样品) 中的卡那霉素竞争结合卡那霉素抗体, 被捕获的卡那霉素抗体结合酶标二抗, 通过TMB底物显色后, 加入终止液终止反应, 用酶标仪在450 nm处测量吸光度 (可选: 在650 nm处的参考波长)。整体吸光值与标准品 (或样品) 中卡那霉素的含量成负相关, 根据卡那霉素标准曲线对样品中卡那霉素含量进行精确定量。

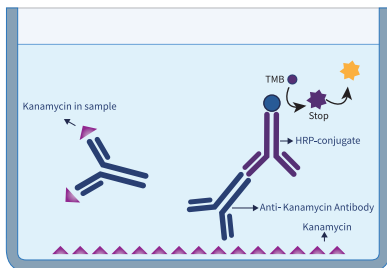


图1.卡那霉素残留ELISA检测试剂盒原理

试剂盒提供的材料

产品组分	编号	规格
Capture Plate	A309801	96孔/板
Kanamycin	A309803	1瓶 (200 μ L)
Anti-Kanamycin Antibody	A309806	1瓶, 冻干粉
HRP-Conjugate	C7788	1支 (60 μ L)
5 $\times$ Sample Dilution Buffer	C6199	1瓶 (10 mL)
20 $\times$ Wash Solution	C2779	1瓶 (40 mL)
TMB Solution	C3679	1瓶 (10 mL)
Stop Solution	C9269	1瓶 (10 mL)
Plate Sealer	N/A	5

Capture Plate: 96孔微孔板 (8孔 $\times$ 12条), 板内配置12条, 板用干燥剂密封在铝箔袋中。

Anti-Kanamycin Antibody: 使用前用1 $\times$ 样品稀释缓冲液溶解重新配制, 溶解后的抗体在2 $^{\circ}$ C-8 $^{\circ}$ C保存长达2周, 若要长期储存, 请在-20 $^{\circ}$ C或以下的条件中储存, 避免反复冻融。

试剂盒未提供的材料与设备

- (1) 能够检测450 nm吸光度的酶标仪, 参考波长650 nm
- (2) 涡旋振荡器、微孔板振荡器
- (3) 离心机
- (4) 移液器、枪头、加样槽等
- (5) 准备试剂用的试管、离心管、量筒等
- (6) 去离子水或蒸馏水
- (7) 吸水纸
- (8) 计时器

储存条件及有效期

检测试剂盒2°C-8°C保存,有效期12个月;开封后,有效期1个月。

注意事项

- (1) 所有的化学试剂理应被认为具有潜在危害,请按照当地规定进行处理。
- (2) 请避免试剂接触皮肤和眼睛,如不慎接触,请立即用大量清水清洗。
- (3) 试剂盒中的终止液为酸性溶液,在使用终止液时,请佩戴防护服,及防护眼睛、手及面部的设施。
- (4) 本试剂盒用于科学研究,不得用于其它用途。
- (5) 为保证测试的准确性,请不要使用其他批号或其他来源的试剂替代本试剂盒中的试剂,请不要使用超过规定效期的试剂,可能会引起灵敏度的降低。
- (6) 在试剂盒的贮存或孵育过程请避免强光照射。
- (7) 为了避免微生物的污染,以及试剂与样本间的交叉污染,请使用一次性枪头。
- (8) 实验过程中,不要让孔板长时间处于干燥状态,清洗步骤完成后立即进行下一步。
- (9) 该试剂盒最佳反应温度为25°C,温度过高或过低将导致检测吸光度值和灵敏度发生变化,会直接影响检测结果。温育过程中应随时观察温箱温度是否恒定,及时调整。

试剂配制

检测前,请将所有的试剂、样本平衡到室温(20°C-25°C)。所有样品和试剂在使用前均应进行涡旋,使用后立即放回冰箱。若浓缩的试剂出现结晶,37°C水浴,直至结晶完全溶解。

● 1×清洗液

用去离子水或蒸馏水稀释20×清洗液至1×清洗液,备用。

● 1×样品稀释缓冲液

用去离子水或蒸馏水稀释5×样品稀释缓冲液至1×样品稀释缓冲液,备用。

● Anti-Kanamycin Antibody

用400 μL 的1 $\times$ 样品稀释缓冲液溶解Anti-Kanamycin Antibody,室温下放置5 min,此为50 $\times$ 抗体工作液,每次实验需根据标准品和待检样本的数量取相应体积用1 $\times$ 样品稀释缓冲液按1:50稀释。

● HRP-Conjugate

根据标准品和待检样本的数量,用1 $\times$ 样品稀释缓冲液按1:100稀释浓缩的HRP-Conjugate。

● 标准品配制

取10 μL 卡那霉素标准品原液加入990 μL 的1 $\times$ 样品稀释缓冲液中稀释100倍,确保充分混匀,从中取30 μL 加入270 μL 的1 $\times$ 样品稀释缓冲液,此卡那霉素稀释液浓度为60.75 ng/mL,记为ST-1。取100 μL 的ST-1加入200 μL 的1 $\times$ 样品稀释缓冲液混匀,记为ST-2,以此类推,稀释至ST-6。以1 $\times$ 样品稀释缓冲液作为标准曲线的零浓度。

表1. 标曲样品溶液配制

标曲样品	加样	卡那霉素浓度 (ng/mL)
ST-1	30 μL 稀释100倍标准品原液+ 270 μL 1 $\times$ 样品稀释缓冲液	60.75
ST-2	100 μL ST-1+200 μL 1 $\times$ 样品稀释缓冲液	20.25
ST-3	100 μL ST-2+200 μL 1 $\times$ 样品稀释缓冲液	6.75
ST-4	100 μL ST-3+200 μL 1 $\times$ 样品稀释缓冲液	2.25
ST-5	100 μL ST-4+200 μL 1 $\times$ 样品稀释缓冲液	0.75
ST-6	100 μL ST-5+200 μL 1 $\times$ 样品稀释缓冲液	0.25
ST-7	1 $\times$ 样品稀释缓冲液	0

标曲拟合范围为ST-1~ST-6。

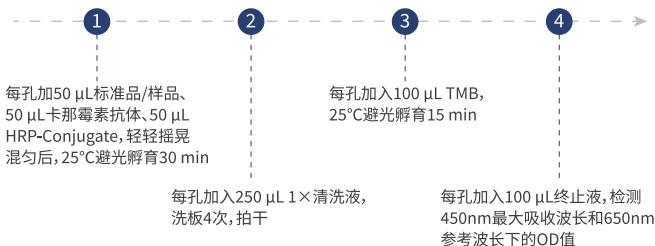
● 样品准备

未知的样品,必须在检测前进行稀释,以获得准确的卡那霉素检测值,且在试剂盒的线性范围内。建议对未知样品进行连续多次的10倍稀释,以确保至少有一个稀释的样品在标准曲线的范围内。通常需要将样品稀释10-10000倍。建议所有样品都准备一式两份。将结果乘以稀释系数,确定原始样品中的卡那霉素浓度值。

操作流程

- (1) 按试剂配制步骤制备好卡那霉素标准品和样品。将不需要的板条拆卸下来，放回铝箔袋中重新封好封口，保存于2°C-8°C。
- (2) 标准品/样品、卡那霉素抗体和酶标二抗孵育：在相应孔中加入50 μ L标准品 (ST-1~ST-7) /样品, 50 μ L的1 $\times$ Anti-Kanamycin Antibody, 50 μ L 的HRP-Conjugate, 振荡混匀后, 用封板膜覆盖平板, 25°C避光孵育30 min。
- (3) 洗板：取下封板膜, 弃掉孔板中液体, 每孔加入250 μ L的1 $\times$ 清洗液, 充分洗涤4次, 每次浸泡30 s, 在清洗步骤后将倒置的平板放在吸水纸上拍干, 为了保证理想的实验性能, 需尽量去除残留液体。
- (4) 显色：每孔加入100 μ L显色液, 轻轻振荡混匀, 25°C避光孵育15 min (在第一孔加入显色液后开始计时)。
- (5) 检测：每孔加入100 μ L终止液, 轻轻振荡混匀, 立即使用酶标仪进行双波长检测, 测定450 nm最大吸收波长和650 nm参考波长下的OD值。校准后的OD值为450 nm的测定值减去650 nm的测定值 (仅使用450 nm测定会导致OD值偏高, 并且准确度降低)。

ELISA流程总结



数据处理

结果判定有两种方法,粗略判定可用第 1 种方法,定量判定用第 2 种方法。注意样品吸光值与其所含卡那霉素成负相关。

1. 粗略分析

用样品的平均吸光度值与标准值比较即可得出卡那霉素浓度范围。例如样品的吸光度值为介于 2 ng/mL-8 ng/mL 所对应的吸光度值之间。则样品的浓度范围是 2 ng/mL-8 ng/mL,再乘以其对应的稀释倍数,即可得出样品中卡那霉素的实际浓度。

2. 定量分析

(1) 百分吸光率的计算,标准品或样品的百分吸光率等于标准品或样品溶液的平均吸光度值(B)除以 0 值溶液的平均吸光度值(B_0),即:

$$\text{百分吸光度值 (\%)} = B/B_0 \times 100\%$$

B—标准溶液或样品溶液的平均吸光度值

B_0 —0 值溶液的平均吸光度值

(2) 标准曲线的绘制与计算

以卡那霉素标准品浓度 (ng/mL) 作为横坐标,以标准品的百分吸光度值作为纵坐标,利用绘图和统计学等软件,采用四参数逻辑曲线拟合程序,通过标准曲线的各个点计算出最佳拟合的线性关系。将样品的百分吸光度值代入标准曲线中,从标准曲线上读出样品所对应的浓度,乘以其对应的稀释倍数即为样品中卡那霉素实际浓度。

产品数据展示

1. 标曲数据

数据拟合绘制标准曲线,生成的标准曲线用于实验数据分析。

表2. 卡那霉素残留ELISA检测试剂盒标准曲线数据

卡那霉素浓度 (ng/mL)	百分吸光度值 (%)
60.75	7.20
20.25	13.15
6.75	26.36
2.25	52.27
0.75	71.06
0.25	81.14
Blank	100

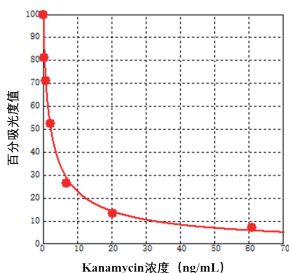


图2. 卡那霉素残留ELISA检测试剂盒标准曲线

2. 线性范围

试剂盒的线性范围为0.25 ng/mL-60.75 ng/mL。

3. 精密度

使用试剂盒，分别对卡那霉素高、中、低3个浓度的样本进行测试，每个样本重复检测5次，每个样本计算5次测量浓度结果的平均值，计算变异系数(CV)。根据性能评估结果，所测结果CV(%)均低于10%，表明试剂盒精密度良好。

表3. 卡那霉素残留ELISA检测试剂盒的精密度验证

卡那霉素浓度	重复次数	OD均值	CV(%)
20.25 ng/mL	5	0.1891	0.4
2.25 ng/mL	5	0.9765	5.0
0.25 ng/mL	5	1.9666	5.4

4. 准确性

在标准曲线的线性范围内,制备高、中、低3个浓度点的卡那霉素质控样品进行测定,分析质控样品检测浓度相对偏差和回收率。质控样品检测浓度均值相对偏差低于20%,质控样品回收率在80% -120%之间。

表4. 卡那霉素残留ELISA检测试剂盒的准确性验证

质控样品	高	中	低
样品理论浓度 (ng/mL)	50	5	0.5
检测浓度均值 (ng/mL)	52.00	5.73	0.48
相对偏差 (%)	4.0	14.6	4.0
回收率 (%)	104.0	114.6	96.0

4. 交叉反应

使用试剂盒,评估交叉反应物四环素、硫酸链霉素、氨苄青霉素及氯霉素对体系的干扰,在基质中分别添加浓度0.5 µg/mL的四种交叉反应物,交叉反应率均小于0.1%。

表5. 卡那霉素残留ELISA检测试剂盒的交叉反应结果及分析

交叉反应物	交叉反应率
卡那霉素	100%
四环素	<0.1%
硫酸链霉素	<0.1%
氨苄青霉素	<0.1%
氯霉素	<0.1%



杭州艾策生物技术有限公司

☎ 0571-87032695

✉ support@acnovia.com

🌐 www.acnovia.com

📍 浙江省杭州市钱塘区下沙街道福城路400号5幢1层