



氨苄西林(Ampicillin)酶联免疫吸附检测试剂盒说明书

(2 步法)

应用：定量检测血清、细胞培养基、牛奶、奶粉、组织样等样本中氨苄西林的残留

产品编号：NEGEA0001

本试剂盒仅供科研使用，不得用于临床及诊断使用！

目 录

一、背景介绍.....	2
二、实验原理.....	2
三、试剂盒组分.....	2
四、实验需要但未提供的耗材及设备.....	3
五、实验前试剂配制及准备.....	3
六、样本前处理.....	3
七、操作步骤.....	5
八、注意事项.....	6
九、数据处理.....	7
十、质量控制.....	8
十一、安全注意事项.....	8
十二、联系我们.....	9



一、背景介绍

氨苄西林(Ampicillin)又称氨苄青霉素,属于β-内酰胺类抗生素家族,曾在预防和治疗动物疾病方面发挥非常重要的作用,可治疗多种细菌感染,包含呼吸道感染、泌尿道感染等,也能用于预防新生儿的B群链球菌感染,可经由口服、肌肉注射以及静脉注射给药。

由于会引起过敏反应和耐药性,在动物食品中的残留会影响人类健康,因此,欧美国家及我国均要求其限量使用。与常规仪器分析相比,Elisa试剂盒法快速、简便、准确、灵敏,因此可以大大减少操作误差和工作强度。

二、实验原理

本试剂盒采用间接竞争法。在预先包被有氨苄西林的酶标板中同时加入标准品(或样本)和氨苄西林单抗,此时酶标板上包被的抗原与标准品(或样本)中的抗原竞争结合氨苄西林单抗,室温孵育后洗涤去除未结合部分,加入HRP标记的二抗与已结合的氨苄西林单抗结合,孵育结束洗涤去除未结合部分。最后用TMB底物显色,样本吸光值与其残留物中的氨苄西林浓度呈负相关,代入标准曲线再乘以其对应的稀释倍数,即可得出样本中氨苄西林的含量。

三、试剂盒组分

请按照试剂标签提示的贮存条件存放试剂,并请在保质期前使用。

	名称	规格	数量	保存
1	已包被平底微孔板	96 孔	1 板 (可拆卸)	2-8℃密封冷藏
2	氨苄西林标准品母液 (32μg/mL)	20μL	1 瓶	-20℃冷冻
3	氨苄西林单抗 (100×)	100μL	1 瓶	2-8℃冷藏
4	HRP偶联的检测抗体 (100×)	150μL	1 瓶	2-8℃冷藏
5	稀释液 (10×)	10mL	1 瓶	2-8℃冷藏
6	TMB	10mL	1 瓶	2-8℃避光冷藏
7	洗液 (100×)	10mL	1 瓶	2-8℃冷藏
8	终止液	10mL	1 瓶	2-8℃冷藏
9	封板膜		4 张	
10	使用说明书		1 份	



四、实验需要但未提供的耗材及设备

1. 移液器：10 μ L-1000 μ L
2. 多道移液器
3. 灭菌的去离子水或超纯水 1L
4. 灭菌 EP 管
5. 吸水纸
6. 酶标仪
7. 高速离心机
8. 洗板机或者洗瓶
9. 恒温箱或水浴锅（可选）
10. 数据分析及绘图软件
11. 三氯乙酸（TCA）、Tris-base

五、实验前试剂配制及准备

1. 试剂盒内所有试剂及包被板，请在使用前的 30 分钟拿出，使其恢复室温。
2. 1M Tris-HCl (pH9.6)：称取 12.114g Tris 碱溶于 80ml 去离子水，调节 pH 值到 9.6，定容至 100ml 即可。
3. 洗液的稀释：将体积为 10mL 的 100 $\times$ 洗液母液，加入 990mL 去离子水或超纯水，混匀备用。如果浓缩液中有少许结晶，请将其置于室温，并轻轻震荡至晶体完全溶解。1 $\times$ 洗液在 2-8 $^{\circ}$ C 中可以稳定保存 2 周。
4. 稀释液（1 $\times$ ）的准备：将 10mL 稀释液（10 $\times$ ），加入 90mL 去离子水或超纯水，混匀备用。如果浓缩液中有少许结晶，请将其置于室温，并轻轻震荡至晶体完全溶解。
5. 10mM PBS (pH7.4) 的配制比例：准确称取 0.02g KH_2PO_4 ，0.29g $\text{Na}_2\text{HPO}_4 \cdot 12\text{H}_2\text{O}$ ，0.8g NaCl ，0.02g KCl ，溶于 80ml 去离子水，定容至 100ml 即可。
6. 3%TCA：称取 3g 的 TCA，加入去离子水定容至 100mL 混匀。

六、样本前处理

1. 牛奶样本
 - (1) 4 $^{\circ}$ C，2000 $\times$ g 离心 10 分钟，弃上层脂肪层
 - (2) 将脱脂后的牛奶样本用样本稀释液稀释 10 倍
 - (3) 调节 pH 值至 7.0—7.4
2. 组织（鸡肉、猪肉）样本
 - (1) 称取 5g 精细切碎并经均质处理的组织，置于 EP 管中
 - (2) 加入 20mL 样本稀释液
 - (3) 均质处理 30 分钟



(4) 取部分混合液，4°C，4000×g 离心 10 分钟，弃上层脂肪层

(5) 取 50μL 上清液至新的 EP 管中，加入 450μL 样本稀释液，混匀备用

3. 脂肪样本

(1) 称取 1g 经均质处理的脂肪样本，置于 EP 管中

(2) 加入 10mL 样本稀释液，置于 70°C 水浴中加热 30 分钟

(3) 4°C，2000×g 离心 15 分钟，弃上层脂肪层

(4) 取 1mL 样本至新的 EP 管中，加入 4mL 样本稀释液，混匀备用

4. 血清样本

用样本稀释液将血清样本稀释 10 倍，再加入 450μL 样本稀释液，混匀备用

5. 蜂蜜样本

(1) 称取 1g 经均质处理的蜂蜜，置于 EP 管中

(2) 加入 4mL 样本稀释液，充分混匀

(3) 静置 1 分钟，使样本中的固体部分与液体部分分层

(4) 取 1mL 澄清的上层液体至新的洁净离心管中，加入 4mL 样本稀释液，混匀备用

6. 鸡蛋样本

(1) 将鸡蛋（含蛋清与蛋黄）充分均质处理

(2) 取 1mL 均质后的样本至洁净离心管中，加入 4mL 样本稀释液，混匀备用

7. 尿液样本

(1) 用样本稀释液将尿液样本稀释 10 倍

(2) 调节 pH 值至 7.0—7.4

8. 饲料样本

(1) 称取 1g 精细切碎并经均质处理的饲料样本，置于 EP 中，加入 5mL 3%TCA 溶液

(2) 均质处理 1 分钟，翻转混匀 30 分钟

(3) 4°C，2000×g 离心 10 分钟，弃上层脂肪层

(4) 取 100μL 上清液至新的 EP 管中，加入 900μL 样本稀释液，充分混匀

(5) 调节 pH 值至 7.0—7.4

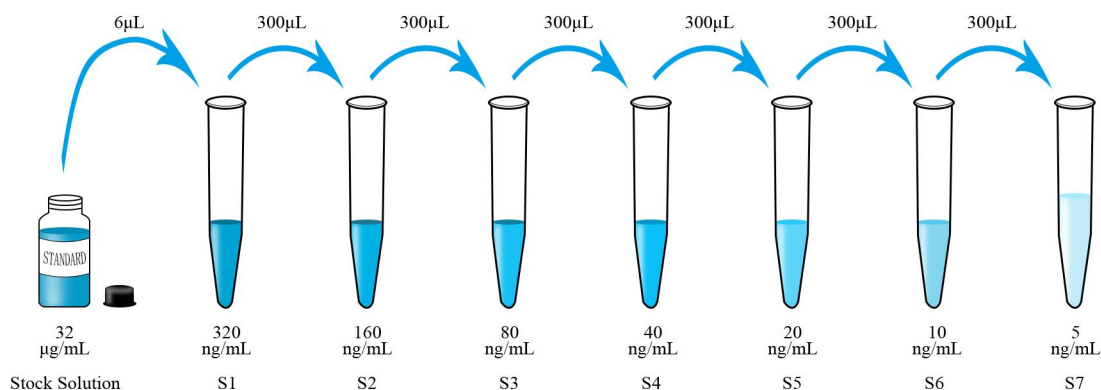
注：处理好的样本可在 2 - 8°C 保存 1 天。

七、操作步骤

1. 撕开包装袋，取出包被有氨苄西林的酶标板，拆下不需要使用的板条，并用封板膜封好，放回铝箔袋，重新放回4℃保存（拆塑封后的酶标板在2-8℃密封防潮保存至多1个月，板架可重复使用）。
2. 标准品的稀释：配置标准品时提前标记7支样品稀释管，预加入一定体积的稀释液，其中S1(594μL)，S2至S7（各300μL）。

（1）取 6μL 标准品母液（浓度为 32μg/mL）加入到标记为 S1 的管，轻轻吹打并颠倒 2 次混匀即可（后续操作相同，切勿涡旋等剧烈混匀）。

（2）取 300μL 浓度为 320ng/mL 的标准品 S1 到下一管，之后以 2 倍梯度稀释至 S7。



注：标准曲线有7个点，分别命名为S1……S7。其中S1即标准曲线的最高浓度点（320ng/mL）。

3. 单抗的稀释：取50μL单抗母液（100×）加入4950μL稀释液中，轻轻吹打并颠倒混匀，使其充分稀释至工作浓度（1×）。
4. 加样：取50μL稀释后的单抗及50μL各个浓度的标准品/样品加入微孔板中（空白对照孔加入50μL单抗及50μL稀释液）。
5. 将酶标板用封板膜密封后室温振荡孵育1.5小时。
6. 洗板机洗板：
 - 取出稀释好的洗液放置于洗板机的洗瓶中备用。
 - 取出孵育好的微孔板，甩去微孔中的液体，洗板机洗板5次。
 - 洗板完成后，将微孔板倒扣在吸水纸上拍打，充分拍干至无明显水膜为止。

或手动洗板：



- 取出稀释好的洗液放置于洗瓶中备用。
 - 取出孵育好的微孔板，甩掉微孔中的液体，在吸水纸上轻轻拍打至无明显液滴。
 - 用多道移液枪向每个微孔中加300 μ L洗液，静置20s，倒去洗液，将微孔板倒扣在吸水纸上轻轻拍打。重复5次。注：第五次洗板时，充分拍干至无明显水膜为止。
7. HRP标记的检测抗体（1 $\times$ ）：取100 μ L检测抗体母液（100 $\times$ ）加入到10mL稀释液（1 $\times$ ）中，轻轻吹打并颠倒混匀，使其充分稀释至工作浓度后（1 $\times$ ），各孔加100 μ L溶液，贴上封板膜，室温孵育1.5小时，按步骤6操作洗板。
8. 显色：向每个孔中加入100 μ L底物TMB，贴上封板膜，轻轻震荡30秒混匀，室温避光静置显色10-30分钟。注：显色时间因实验室条件（温度、湿度等）会有一定差异。
9. 显色终止及读板：直接向含有底物的微孔中加入50 μ L的终止液，终止反应，轻轻震荡10秒混匀，立即转移到酶标仪上，在450nm下读取吸光度值。

八、注意事项

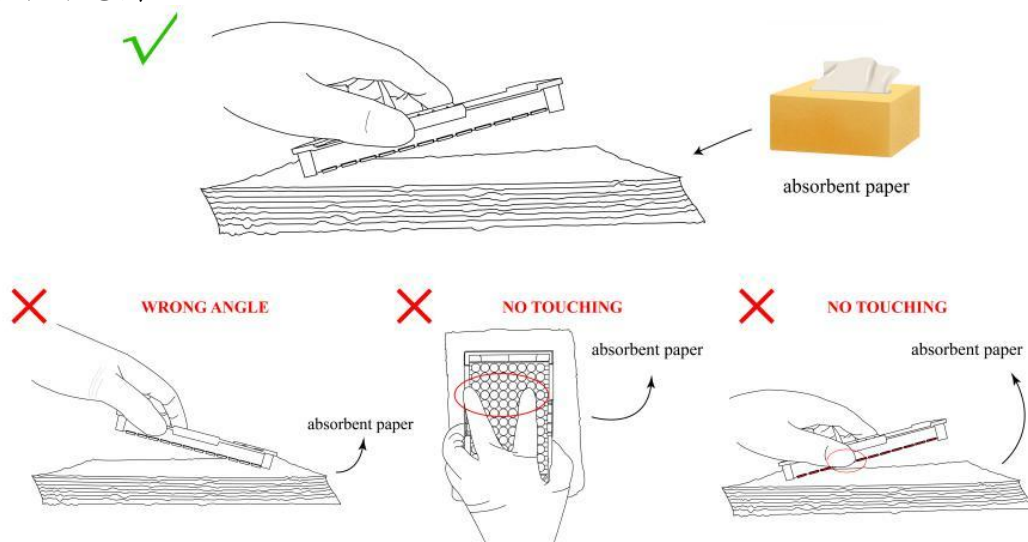
（一）样本收集注意事项

1. 采集样本后如果短期内不使用，请将样本分装后冷冻保存，避免反复冻融。冷冻样本使用前请保证充分化冻，使用前用移液器或者 Vortex 混匀，可离心除去絮状不溶物。
2. 建议所有标准品及样本都设置复孔。向微孔中加入试剂或样本后，请轻轻震荡使液体混匀，并尽量保证不要有气泡。

（二）实验操作注意事项

1. 请不要将本试剂盒的试剂与其他试剂盒试剂交叉使用。
2. 实验操作使用一次性吸头，避免交叉污染。
3. 加样：加样时要控制时间和速度，一般加样时间控制在3分钟内。如果样本数量过多，可使用多道移液器。
4. 洗涤：洗涤时微孔中残留的洗涤液应在吸水纸上充分拍干，并要消除板底残留的液体和手指痕迹，避免影响最后的酶标仪读数。
5. 由于底物TMB溶液是光感性的试剂，使用前请勿长时间暴露于可见光下。同时要避免TMB与金属接触。

6. 反应时间的控制：加入底物后请定时观察反应孔的颜色变化（比如，10分钟左右），如果颜色较深，请提前加入终止液终止反应。
7. 本试剂盒中使用了稀硫酸作为终止液，其具有轻微腐蚀性，使用时应避免接触衣物或眼、手等皮肤暴露部位。
8. 标准曲线的 $R^2 \geq 0.95$ 。
9. 拍板示意图：

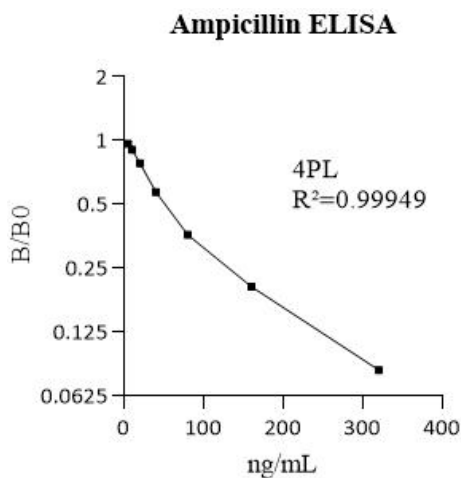


九、数据处理

1. 百分吸光度值的计算：标准品和样本吸光值的平均值（B）除以空白孔（0标准品）的吸光度平均值（B0）再乘以100%，即百分吸光度值。
百分吸光度值（%）= $B/B_0 \times 100\%$
2. 标准曲线的绘制与计算：以标准品百分吸光率为纵坐标，以氨苄西林标准品浓度为横坐标，绘制四参数logistic(4-PL)标准曲线图。
3. 将样本的百分吸光率代入标准曲线中，从标准曲线上读出样本所对应的浓度，乘以其对应的稀释倍数即为样本中氨苄西林的浓度。
注：当标准品S0 的吸光度值小于0.5时，表示该试剂盒可能变质。
4. 以下曲线仅供参考。



附件一、标准曲线实例



ng/mL	OD450nm	B/B0
320	0.218	0.083
160	0.535	0.205
80	0.938	0.360
40	1.493	0.573
20	2.041	0.783
10	2.366	0.908
5	2.519	0.967

十、质量控制

- 1. 批内差 CV%: <10%
- 2. 批间差 CV%: <10%
- 3. 回收率

样本类型	回收率 (%)
牛奶	80-120
奶粉	80-100
组织	80-120
血清	100-120
血浆	100-130
培养基	80-120

- 4. 灵敏度 LOD: 2.5ng/mL LOQ: 5ng/mL
- 5. 局限性: 本试剂盒不适用于含有叠氮化钠(NaN₃)的样本, 因为叠氮化钠是 HRP 的强抑制剂, 会降低检测到目的蛋白的浓度。

十一、安全注意事项

- 1. 本试剂盒显色底物 TMB (3,3',5,5'-Tetramethylbenzidine) , 有一定的致病风险。如果接触到 TMB, 请用大量的水冲洗。
- 2. 终止液是硫酸溶液, 请勿让眼睛皮肤及衣物接触终止液。操作时戴上手套, 实验服及面罩。



十二、联系我们

公司地址：上海市浦东新区紫萍路889弄6号楼

网址：www.cellgenebio.com或www.bluegene.cc或www.elisakit.cc

联系电话:400-882-6373/021--61106433/021--61106434/021-61106435/021--61106436

国内市场部	
售前一	QQ: 2247355151 或邮箱: sale_bluegene@163.com
售前二	QQ: 3247299548 或邮箱: sale_cellgene@163.com
技术部售后	tech@bluegene.cc
其他咨询	sales@bluegene.cc