

## **resDetect™庆大霉素残留检测试剂盒**

货号: RES-A025

规格: 96 tests

**重要提示:**在进行实验之前, 请仔细阅读本手册仅供研究使用。不适用于诊断或治疗过程。

## 用途:

庆大霉素酶联免疫吸附测定试剂盒该试剂盒使用NIFDC和USP标准品进行校准，用于CGT、疫苗和其他生物药物的质粒DNA原料和蛋白质中残留庆大霉素的定量测定。仅供研究使用(RUO)。

## 背景:

庆大霉素是从放线菌科单孢子属发酵培养液中提得，系碱性化合物，是常用的氨基糖苷类抗生素，广泛应用于培养基配制。在临床上主要用于治疗细菌感染。庆大霉素具有神经毒性、肾脏毒性以及耳毒性。其在动物食品、生物药品中的残留会影响人类健康，甚至引起过敏反应。欧美国家及我国均要求其限量使用。

## 试剂盒原理:

庆大霉素定量检测试剂盒采用竞争 ELISA 法，将微孔板上预包被的庆大霉素偶联抗原与样品中残留的庆大霉素竞争结合酶标抗庆大霉素单克隆抗体，然后通过添加 TMB 底物使用酶标板读取器检测吸光度值，吸光度值与样品中庆大霉素含量呈负相关。该试剂盒仅需约 1 小时 20 分钟即可操作，线性范围为 0.25 ng/mL 至 8 ng/mL。

## 注意事项:

1. 本试剂盒仅供研究使用，不用于诊断或治疗应用。
2. 本试剂盒适用于于 CGT、疫苗和其他生物药物的质粒 DNA 原料和蛋白质中残留庆大霉素的定量测定。
3. 对于其他生物制品样品的检测，建议进行用户适用性验证，以排除基质干燥干扰。
4. 不要使用超过有效期的试剂。
5. 不要与其他试剂盒或其他批号试剂盒的试剂混合或替代。
6. 检测结果的差异可由多种因素引起，包括实验室操作人员、移液器使用、洗板技术、反应时间或温度以及试剂盒储存。
7. 本试剂盒旨在去除或减少生物样品中的一些内源性干扰因素，并不是所有可能的影响因素都被去除。

## 试剂盒组分:

表一:试剂盒组分

组分货号	组分	规格	物理状态	存储条件	
				未打开	已打开
RES-A025-C01	庆大霉素预包板	1 plate	固相载体	未打开	已打开
RES-A025-C02	庆大霉素标品	0.1152 µg	冻干粉	2-8°C, 避光	2-8°C, 避光
RES-A025-C03	酶标庆大霉素抗体	6 mL	液体	2-8°C	-70°C
RES-A025-C04	1×稀释液	50 mL	液体	2-8°C, 避光	2-8°C, 避光
RES-A025-C05	20×浓缩洗液	50 mL	液体	2-8°C	2-8°C
RES-A025-C06	显色液	12 mL	液体	2-8°C	2-8°C
RES-A025-C07	终止液	7 mL	液体	2-8°C, 避光	2-8°C, 避光

## 储存:

1. 试剂盒收到货后储存在 2-8°C。
2. 重构后的庆大霉素标准品每管分装 300 µL 以上在-70°C可稳定储存 24 个月，不可反复冻融使用。
3. 有效期显示在外包装上，不要使用超过有效期的试剂。
4. 试剂盒打开后个组分按照表 1 存贮条件保存，有效期自开封之日起为 30 天，未使用完的微孔板条需与干燥剂一起密封保存。

## 需要但未提供设备:

移液器、37°C恒温培养箱、酶标仪、离心管、试剂瓶、超纯水等

## 实验前注意事项:

1. 试剂盒在使用前需平衡至室温。
2. 使用后的试剂盒需立即放回对应储存温度。
3. 样品及标准品准备完成后才可以将酶标板开封，未使用的酶标板条需立即放进提供的密封袋中 2-8°C 避光储存。
4. 根据表 2，庆大霉素标准品加入 1.8 mL 超纯水室温静置 10 分钟后轻轻震荡混匀后即可使用，未使用的庆大霉素标品每管至少分装 300  $\mu$ L 立即储存在 -70°C，不可冻融使用。

表 2. 重构方法

组分货号	组分	规格	重构后庆大霉素浓度	超纯水体积
RES-A025-C02	庆大霉素标品	0.1152 $\mu$ g	64 ng/mL	1.8 mL

## 样品准备:

### 工作液配置

#### 1.1 1 $\times$ 洗液配置

将 25 mL 20 $\times$ 浓缩液稀释加超纯水定容至 500 mL。

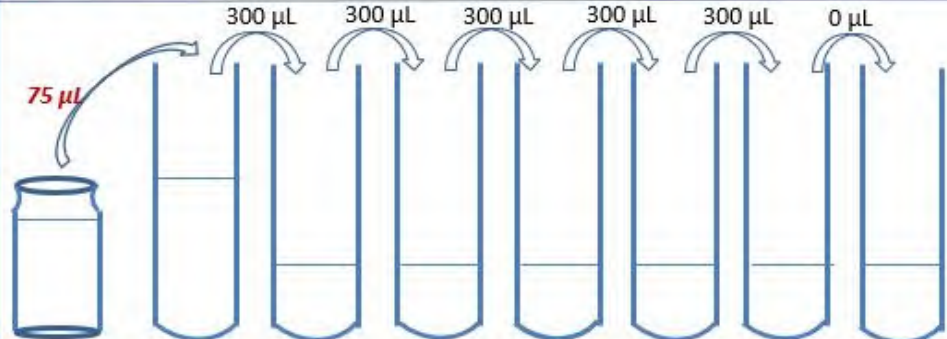
#### 1.2 样品准备

多数样品按照样品本身的干扰所确定的稀释比进行稀释。

## 实验操作过程:

### 1. 制作标曲

将庆大霉素标准品稀释至 8 ng/mL, 4 ng/mL, 2 ng/mL, 1 ng/mL, 0.5 ng/mL, 0.25 ng/mL, 0 ng/mL 浓度范围。具体操作如下:

Tubes/ Solution Code	Gentamicin standard stock solution	Std.-1	Std.-2	Std.-3	Std.-4	Std.-5	Std.-6	Std.-7
Operating		300 µL	300 µL	300 µL	300 µL	300 µL	300 µL	0 µL
Solution Con.	64 ng/mL	8 ng/mL	4 ng/mL	2 ng/mL	1 ng/mL	0.5 ng/mL	0.25 ng/mL	0 ng/mL
Dilution Buffer Vol.		525 µL	300 µL	300 µL	300 µL	300 µL	300 µL	300 µL

## 2. 加入样品及抗体

向酶标板中加入 50 µL 样品及标曲，然后立即加入 50 µL 酶标庆大霉素抗体溶液，封板膜密封后 37°C 避光孵育 1 小时。

*注：标曲及样本建议设置复孔。*

## 3. 洗板

小心揭开封板膜，将板内液体甩去，加入洗涤工作液 300 µL/孔，充分洗涤 4 次，用吸水纸或卫生纸拍干。

## 4. 显色

加入 100 µL 显色液至反应孔中，放入 37°C 恒温培养箱中避光孵育 20 分钟。

## 5. 终止

加入 50 µL 终止液至反应孔中，轻轻拍打混匀。

*注：孔中的颜色应从蓝色变为黄色。*

## 6. 读数

设置酶标仪至 450 nm 处（建议用双波长 450/630 nm 检测，建议 5 分钟内读完），测定每孔 OD 值。

注：为了减少背景噪声，请将在  $OD_{450\text{ nm}}$  处读取的值减去在  $OD_{630\text{ nm}}$  处读取的值。

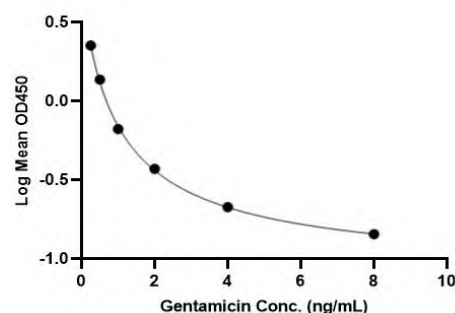
## 结果判定:

1. 以标准浓度为 x 轴，以 Log 吸光度值为 y 轴绘制标准曲线。四参数拟合用于绘制标准曲线并计算样品浓度。
2. 标准曲线正常范围： $R^2 \geq 0.9900$ 。
3. 检测范围：0.25 ng/mL-8 ng/mL。如果待测样品的 OD 值高于 8 ng/mL，则应用稀释缓冲液稀释样品并重复测定。小于分析标准曲线的样品应报告为小于 0.25 ng/mL。

## 典型数据:

对于每个实验，需要为每个微孔板设置标准曲线，具体 OD 值可能因实验室，测试人员或设备而异。以下示例数据仅供参考。根据标准曲线的结果计算样品浓度。

标准品浓度. (ng/mL)	OD450-1	OD450-2	平均值
8.00	0.133	0.153	0.143
4.00	0.202	0.222	0.212
2.00	0.354	0.388	0.371
1.00	0.625	0.704	0.665
0.50	1.287	1.443	1.365
0.25	2.223	2.271	2.247



## 线性与范围:

线性区间为 0.25-8 ng/mL， $R^2 > 0.99$ ，各浓度点回算浓度与理论浓度  $CV \leq 20\%$ 。

庆大霉素浓度(ng/mL)	8	4	2	1	0.5	0.25
OD 值	0.133	0.202	0.354	0.625	1.287	2.223
	0.153	0.222	0.388	0.704	1.443	2.271
OD 值 CV(%)	10	7	6	8	8	2
相对误差 RE(%)	1	0	-2	4	-4	2

## 定量限:

浓度回收率在 80-120%之间且 OD 值  $CV \leq 20\%$ 时所对应的最高浓度为 8 ng/mL，确认为试剂盒定

量上限(ULOQ)。浓度回收率在 80-120%之间且 OD 值  $CV \leq 20\%$  时所对应的最低浓度为 0.25 ng/mL, 确认为试剂盒定量下限 (LLOQ)。

	定量上限(ULOQ) (8 ng/mL)	定量下限(LLOQ) (0.25 ng/mL)
OD 值 CV(%)	3	6
浓度回收率(%)	102	90

### 准确度:

制备高中低 3 个不同浓度的庆大霉素样品, 检测浓度回收率均在 80-120%之间。

样品	1	2	3
样品浓度(ng/mL)	8	2	0.25
检测浓度(ng/mL)	8.14	2.32	0.23
回收率(%)	102	116	90

### 精密度:

#### 1. 中间精密度

2 个实验员对高中低 3 个浓度样品进行检测, 以评估中间精密度, 检测浓度  $CV \leq 20\%$ 。

实验人员	1			2		
	1	2	3	1	2	3
样品	1	2	3	1	2	3
样品浓度(ng/mL)	8	2	0.25	8	2	0.25
检测浓度(ng/mL)	8.14	2.32	0.23	10	1.86	0.26
浓度 CV(%)	1	11	7	15	5	3

#### 2. 重复性

对 3 个不同浓度的样品进行 10 个复孔测定, 以评估重复性, OD 值  $CV \leq 10\%$ , 检测浓度  $CV \leq 20\%$ 。

质控样品	1	2	3
样品浓度(ng/mL)	8	2	0.25

OD 值	0.145	0.318	1.963
	0.139	0.316	1.987
	0.128	0.295	1.938
	0.131	0.301	1.914
	0.134	0.302	1.949
	0.138	0.309	1.959
	0.137	0.324	2.058
	0.157	0.308	2.111
	0.129	0.291	1.841
	0.124	0.301	2.006
OD 值 CV(%)	3	0	2
检测浓度(ng/mL)	8.14	1.86	0.23
浓度 CV(%)	1	11	7

## 专属性:

### 1. 交叉反应

在样品稀释液中分别添加 500 µg/mL 氨苄青霉素，四环素，氯霉素，未观察到明显的交叉反应。

反应物	交叉反应程度
庆大霉素(500 µg/mL)	100%
氨苄青霉素(500 µg/mL)	<1%
四环素(500 µg/mL)	<1%
氯霉素(500 µg/mL)	<1%

### 2. 干扰

在稀释液中添加 2000 ng/mL 大肠宿主蛋白，200 ng/mL 大肠宿主 DNA，100 ng/uL 质粒 DNA，3 个样品回收率均在 70-130%之间。

干扰物	大肠宿主蛋白(HCP) (2000 ng/mL)	大肠宿主 DNA(HCD) (200 ng/mL)	质粒 DNA (100 ng/uL)



样品浓度(ng/mL)	5	2	0.5	5	2	0.5	5	2	0.5
检测浓度(ng/mL)	4.57	2.00	0.400	5.09	2.20	0.58	6.06	2.40	0.62
回收率(%)	91	100	80	102	110	116	121	120	125

### **耐用性:**

在样品结合 45-60 min 时间条件下检测浓度 CV≤20%，回收率均在 80-120%之间，试剂盒的抗原抗体结合时间在 45-60 min 均不影响结果。

结合时间	45 min			60 min		
样品	1	2	3	1	2	3
样品浓度(ng/mL)	5	2	0.5	5	2	0.5
检测浓度(ng/mL)	4.28	2.23	0.47	4.79	1.92	0.43
浓度 CV(%)	11	8	4	3	3	11
回收率(%)	86	112	94	96	96	86