

卡那霉素残留检测试剂盒

(ELISA 法)

说明书

货号：1401402

版本：A/4

仅供研究用

湖州申科生物技术股份有限公司

■ 试剂盒简介

本试剂盒采用间接竞争 ELISA 方法，微孔条上预包被的偶联卡那霉素抗原与样品中残留的卡那霉素竞争结合抗卡那霉素单克隆抗体，被微孔捕获的单克隆抗体结合酶标二抗，TMB 底物显色，酶标仪（450nm）检测吸光值。吸光值与样品中卡那霉素的含量成负相关。通过标准曲线计算浓度值，再乘以其对应的稀释倍数，即可得出样品中卡那霉素的含量。

试剂盒适用于细胞和基因治疗质粒 DNA 原料中的卡那霉素残留检测。

对于其他生物制品样品的检测，建议用户进行适用性验证，以排除基质的干扰。

■ 试剂盒组分

表 1. 试剂盒组分

组分	产品号	装量	储存条件
卡那霉素定量参考品	PNB001	2 瓶	2~8℃，避光
卡那参考品复溶液	PNC001	1.5 mL×2 管	2~8℃
卡那参考品稀释液	PNE001	20 mL×1 瓶	2~8℃
100×卡那抗体	PNG001	60 µL×1 管	2~8℃
100×酶标二抗	PNH001	120 µL×1 管	2~8℃，避光
预包被卡那抗原板	PNA001	8 孔×12 条	2~8℃，避光
10×洗涤液	PNJ001	25 mL×2 瓶	2~8℃
卡那 ELISA 显色液	PND001	12 mL×1 瓶	2~8℃，避光
终止液	PNI001	12 mL×1 瓶	2~8℃
封板膜	PNK001	2 片	2~8℃

■ 规格

96 测试/盒。

■ 有效期

规定储存条件下 12 个月，具体详见试剂盒标签。

■ 实验所需但试剂盒中未含材料

- 10mL 无菌刻度移液管
- 1.5mL、50mL RNase/DNase Free 无菌离心管
- 10μL，200μL，1000μL 单道微量移液器
- 200μL（或 300μL）多道微量移液器
- 1000μL，100μL，10μL RNase/DNase Free 吸头

■ 相关设备

- 酶标仪（可读 450nm）
- 恒温箱（25℃±3℃）
- 振荡器
- 离心机

■ 检测方法性能

试剂盒检测限：< 0.5 ng/mL；
定量线性范围：1 ng/mL~16 ng/mL；
准确度：参考品稀释液加标回收率 80%~120%；
精密度：试剂盒的变异系数小于 20%；
交叉反应率（见表 2）。

表 2. 试剂盒交叉反应率

抗生素	反应率
卡那霉素	100%
链霉素	<1%
氨苄青霉素	<1%
氯霉素	<1%
四环素	<1%

■ 操作过程

❖ 实验前的准备

1. 配制洗涤工作液

用去离子水将 10×洗涤液稀释 10 倍（例如，取 5mL 洗涤液于 50mL 离心管中，加 45mL 去离子水混匀）即为洗涤工作液。

 10×洗涤液如有结晶请于 37℃ 水浴至完全溶解后使用；

 洗涤工作液在 2~8℃ 环境可保存 30 天。

2. 配制卡那霉素参考品溶液

根据卡那霉素定量参考品西林瓶标签上的含量标识，精确量取卡那参考品复溶液加入西林瓶中，使复溶后的参考品溶液卡那霉素浓度为 1 µg/mL。

 复溶后的参考品溶液在 2~8℃ 避光环境可保存 30 天。

3. 所有试剂开封（瓶）使用前应将其提前置于室温（25±3℃）30 分钟。

预包被卡那抗原板先平衡至室温 30 分钟，再开袋取出本次需要数量的板条，剩余板条连同干燥剂置于铝箔袋中密封，放回试剂盒中，保存在 2~8℃ 冰箱，请于 30 天内使用完。

 所有液体试剂使用前均须混匀，100×卡那抗体和 100×酶标二抗还需短暂离心 10 秒，将管壁及盖子上的液体全部集中于管底。

❖ 定量参考品稀释和标曲制备

用试剂盒中提供的参考品稀释液将已复溶的卡那霉素参考品溶液进行梯度稀释，稀释浓度依次为 64 ng/mL、32 ng/mL、16 ng/mL、8 ng/mL、4 ng/mL，2 ng/mL，1 ng/mL，0.5 ng/mL。具体操作如下：

1. 取 8 支 1.5mL 离心管，分别标记为 ST0，ST1，ST2，ST3，ST4，ST5，ST6，ST7。

2. 在 ST0 管中加入 936µL 参考品稀释液，其余各管加入 300µL 参考品稀释液。

3. 取 64µL 参考品溶液，加入 ST0 管，瞬时振荡混匀后短时间快速离心 5s，重复 3 次以确保定量参考品与参考品稀释液充分混匀。

4. 按表 3 依次进行 7 次稀释操作，稀释步骤同表 3。

表 3. 标曲样品溶液配制

标曲样品	加样	浓度 (ng/mL)
ST0	64 μ L 参考品溶液 (1 μ g/mL) + 936 μ L 卡那参考品稀释液	64
ST1	300 μ L ST0 溶液 + 300 μ L 卡那参考品稀释液	32
ST2	300 μ L ST1 溶液 + 300 μ L 卡那参考品稀释液	16
ST3	300 μ L ST2 溶液 + 300 μ L 卡那参考品稀释液	8
ST4	300 μ L ST3 溶液 + 300 μ L 卡那参考品稀释液	4
ST5	300 μ L ST4 溶液 + 300 μ L 卡那参考品稀释液	2
ST6	300 μ L ST5 溶液 + 300 μ L 卡那参考品稀释液	1
ST7	300 μ L ST6 溶液 + 300 μ L 卡那参考品稀释液	0.5
0 值	卡那参考品稀释液	0

 标曲拟合范围为 ST1~ST7。

❖ 样品准备

1. 将待检液体样品 5000 转/分离心 5min 后，取其上清进行检测。

 上清可用参考品稀释液稀释数个梯度后检测；

 为排除样品基质干扰可制备加标样品，如在合适稀释倍数的待检样品中加入终浓度为 4 ng/mL 的卡那霉素。

2. 加入标曲样品或待检样品：将待检样品，标曲样品（ST1~ST7）和卡那参考品稀释液（0 值）对应微孔按序编号。每个待检样品，标曲样品和 0 值做 3 孔平行，并记录所对应的孔位。按 50 μ L/孔加入到对应的微孔底部（推荐使用单道移液器）。

3. 1×卡那抗体工作液准备：根据实验用量（50 μ L/孔），配制 1×卡那抗体工作液，要比实际孔数多配制数孔的用量，用洗涤工作液将 100×卡那抗体稀释 100 倍即为 1×卡那抗体工作液。

4. 加 1×卡那抗体工作液：每孔加入 1×卡那抗体工作液 50 μ L（推荐使用单道移液器）。用封板膜密封后，于微孔板振荡器上 200 转/分水平振荡 30 秒，置 25℃恒温箱静置反应 60 min。

5. 1×酶标二抗工作液准备：根据实验用量（100μL/孔），配制 1×酶标二抗工作液，可比实际孔数多配制 2 孔的用量，用洗涤工作液（见试剂准备）将 100×酶标二抗稀释 100 倍即为 1×酶标二抗工作液。

6. 洗板：小心揭开封板膜，将孔内液体甩干，用洗涤工作液洗板，350μL/孔，充分洗涤 4 次，每次浸泡 30s，并在吸水纸上拍干（拍干后未被清除的气泡可用干净吸头戳破），须立即加入 1×酶标二抗工作液。

7. 加 1×酶标二抗工作液：每孔加入 1×酶标二抗工作液 100 μL（可使用单道移液枪或排枪。）用封板膜密封后，水平振荡器上 200 转/分振荡 30 s，置 25℃恒温箱中避光静置反应 60 min。

8. 洗板：同步骤 6。

9. 显色：加入显色液 100μL/孔，轻轻振荡混匀，置 25℃恒温箱避光反应 15min。

10. 测定：加入终止液 100μL/孔，轻轻振荡混匀，避光静置 10min±2min，设定酶标仪于 450nm 处测定吸光度值。

■ 结果判定

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. 用样品的平均吸光度值与标准值比较即可得出其浓度范围。例如样品的吸光度值为介于 2 ng/mL~4 ng/mL 所对应的吸光度值之间。则样品的浓度范围是 2 ng/mL~4 ng/mL 再乘以其对应的稀释倍数，即可得出样品中卡那霉素残留的浓度范围。

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的吸光度均值除以 0 值的吸光度均值，即：

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

B—标准溶液或样品溶液的平均吸光度值

B0—0 值溶液的平均吸光度值

（2）标准曲线的绘制与计算

以标准品百分吸光度值为纵坐标（y），以卡那霉素标准品浓度（ng/mL）为横坐标（x），可依四参数拟合绘制标准曲线图。标曲拟合范围为 ST1~ST7，0 值不计入标曲。

四参数拟合模式为： $y=(a-d)/[1+(x/c)^b]+d$

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残留量。

■ 注意事项

1. 该试剂盒最佳反应温度为 25℃，温度过高或过低将导致检测吸光度值和灵敏度发生变化。实验过程中微孔板的温育应维持在 25±3℃，以保证检测的稳定性。温度低于 20℃会导致吸光度值降低，应避免。
2. 试剂使用之前均需混匀，使用之后应立即放回 2~8℃冰箱。
3. 待测样品、标曲样品和 1×卡那抗体工作液的加样应准确，推荐使用单通道移液器。
4. ELISA 分析中的再现性，很大程度上取决于洗板的一致性，正确的洗板操作是 ELISA 测定程序中的要点。洗板加液吸头应悬空，勿使接触孔中液体，如有接触应更换吸头。洗板过程中如果出现板孔干燥的情况，可能会造成标准曲线不成线性，重复性不好等异常情况。所以洗板拍干后应立即进行下一步操作，所用试剂应提前配制并准备妥当。
5. 在所有恒温孵育过程中，用封板膜封住微孔板（显色步骤不用封板膜覆盖），并避免光照。
6. 反应终止液为强酸，操作请佩戴好护目镜，避免接触皮肤、眼睛。
7. 勿使用失效试剂盒；勿混用不同批号试剂盒中的试剂。
8. 保存条件
9. 保存试剂盒于 2~8℃，所有试剂切勿冷冻。
10. 将拆封后剩余未使用的微孔板条连同干燥剂放于铝箔袋中密封保存，勿使吸潮，可供 30 天内使用。
11. 卡那霉素参考品、酶标二抗和显色液对光敏感，因此要注意避光处理。

12. 已稀释为标曲的参考品、已稀释为工作液的卡那抗体和酶标二抗应在配制后当天使用，切勿储存后重复使用。应根据每次实验需求配制合适量的工作液，现配现用。

修订日期：2023 年 01 月 09 日

服务支持



湖州申科生物技术股份有限公司

www.shenkebio.com

地址：浙江省湖州市红丰路 1366 号 6 号楼

Email: Info@shenkebio.com

电话：0572-2165910