

产品说明书

产品编号: NBE-236634

版本号: RN6.1



产品名称	NebuEasy™ 可替宁(cotinine)ELISA试剂盒
产品规格	96T
试剂盒参数	◇ 本试剂盒检测下限为0.6ng/ml ◇ B0吸光度最佳值应大于1.0 ◇ 试剂盒吸光度板内误差小于8%，板间误差小于15% ◇ 用本说明书提供的组织样本提取方法回收率大于80% ◇ 标准曲线范围为1.2ng/ml~100ng/ml
储存条件	4℃保存，有效期见标签；未用完的微孔板应4℃密封干燥保存。
产品应用	NebuEasy™ 可替宁(cotinine)ELISA试剂盒（产品编号：NBE-236634）可用于饲料、鱼、虾和肉类组织（如鸡、牛肉和猪肉），鸡蛋、蜂蜜、牛奶、血清和尿样中可替宁（cotinine）残留的定量检测。
检测原理	本试剂盒采用竞争 ELISA 方法，在微孔板包被有可替宁（cotinine）偶联抗原，加入可替宁（cotinine）标准品或样品，游离可替宁（cotinine）与微孔条上预包被的可替宁（cotinine）偶联抗原互相竞争抗可替宁（cotinine）抗体酶标记物，用 TMB 底物显色，加入终止液后颜色由蓝色变为黄色，用酶标仪在 450nm 波长下进行检测，吸光值与样品中可替宁（cotinine）含量成反比，通过标准曲线计算样品中可替宁（cotinine）的含量。
试剂盒组分	◇ 预包被的可替宁偶联抗原的可拆酶标板：1 块（12 孔×8 条） ◇ 可替宁标准品：6 瓶（1ml/瓶），含量分别是：0ng/mL, 1.2ng/mL, 3.6 ng/mL, 10.8ng/mL, 32.4ng/mL, 97.2 ng/mL ◇ 抗可替宁(cotinine)抗体酶结合物：1 瓶（6ml） ◇ 显色液 A：1 瓶（6ml） ◇ 显色液 B：1 瓶（6ml） ◇ 终止液：1 瓶（6ml），2M 硫酸 ◇ 样本稀释液：1 瓶（10×, 6ml），用于样品稀释用 ◇ 浓缩洗涤液：1 瓶（20×, 20ml），用于洗板 ◇ 说明书一份
需自行准备的材料	◇ 波长450nm酶标仪 ◇ 粉碎机 ◇ 量筒

产品说明书

产品编号: NBE-236634

版本号: RN6.1



- ◇ 振荡器
- ◇ 漏斗
- ◇ Whatman No.1或相当的滤纸
- ◇ 微量移液器
- ◇ 去离子水或蒸馏水
- ◇ 甲醇

[操作步骤]

1.工作液准备:

- 1.1 可替宁(cotinine)标准品溶液: 0ng/mL, 1.2ng/mL, 3.6 ng/mL, 10.8ng/mL, 32.4ng/mL, 97.2 ng/mL。
- 1.2 浓缩洗涤液: 用蒸馏水按1:20(1+19)稀释备用。
- 1.3 样本稀释液: 用蒸馏水按1:10(1+9)稀释备用。
- 1.4 显色剂: 已备用, 避免光线直照。
- 1.5 反应终止液: 已备用。

2.样品处理:

注意: 样品在提取过程中, 要严格按说明书操作, 提取过程中应准确稀释, 否则会出现结果不准确, 样品应当保存在阴凉避光之处及冷藏保存。

- 2.1 取10g粉碎的样品, 加 20ml 70%甲醇溶液。
- 2.2 强力振荡3分钟。
- 2.3 用Whatman No 1滤纸过滤。
- 2.4 取25 μ l处理后的样品, 加入25 μ l样本稀释液于反应孔中(样本稀释倍数为2)。

3.酶免分析步骤:

3.1 实验须知

- 3.1.1 实验开始前请将所有试剂于盒外充分恢复至室温 ($25\pm 2^{\circ}\text{C}$), 时间约2小时。回温至室温 ($25\pm 2^{\circ}\text{C}$) 后再取出微孔条, 多余的微孔条重新密封立即于2~8 $^{\circ}\text{C}$ 干燥保存。注意: 一定保证回温充分, 否则影响检测的精确度和准确度。
- 3.1.2 使用后请立即将试剂放回2~8 $^{\circ}\text{C}$ 保存。
- 3.1.3 请不要改变分析程序。
- 3.1.4 请使用精确的微量移液器。
- 3.1.5 操作一旦开始, 请不要中断任何程序。
- 3.1.6 ELISA结果的可重复性极大程度的取决于操作程序, 请严格按照要求操作。
- 3.1.7 为避免交叉污染, 每个标准品和样品均应使用不同的吸头加样。
- 3.1.8 加样时请勿让吸头接触微孔中的溶液或内表面。

3.2 分析步骤

- 3.2.1 预先进行编号, 标记B0、标准品和样品的位置, 推荐进行双孔检测。

产品说明书

产品编号: NBE-236634

版本号: RN6.1



3.2.2 取所需数量的微孔（微孔条可拆），将多余板条重新密封并立即放回2~8℃保存。

3.2.3 样品稀释液（10×）、浓缩洗涤液（20×）稀释成工作液（蒸馏水或去离子水稀释）。

3.2.4 在B0孔中加入50μl 0.0 ng/ml标准品溶液。

3.2.5 在各标准孔中加入50μl的标准品溶液。

3.2.6 在各样品孔中加入50μl样品溶液。

3.2.7 在所有孔中加入50μl的抗可替宁(cotinine)抗体酶结合物。

3.2.8 轻轻晃动反应板几秒钟。

3.3 37℃温浴30min

注意：温浴过程中不时轻拍反应板，可以减少双孔误差。

30分钟后，甩掉孔中液体，用洗液洗涤微孔板5次，最后一次应在吸水纸上拍打以完全除去孔中液体。

3.4 反应

3.4.1 洗涤程序完成后，立即用微量移液器在每个微孔中先加入50μl显色液A，再加 50μl显色液B；轻微晃动反应板使之彻底混匀。

3.4.2 37℃温浴10min。

3.4.3 每孔中加入50μl终止液，混匀。

3.4.4 在450nm下检测吸光度，结果在5min内读取。

[结果计算]

1. 定量分析

1.1 所获得的每个浓度标准溶液和样本吸光度值的平均值（B）除以第一个标准（0标准）的吸光度值（B0）再乘以100%，即百分吸光度值。

B—标准溶液或样本溶液的平均吸光度值

B0—0 ng/ml标准溶液的平均吸光度值

1.2 以可替宁(cotinine)浓度的对数值为X轴，百分吸光度值为Y轴，绘制标准曲线图。根据样品百分吸光度值，可从曲线上得到对应点的横坐标，即为可替宁(cotinine)浓度的对数值，求得反对数即为测定液中可替宁(cotinine)浓度C（ng/ml）。

1.3 由于样品经过了预先稀释，因此根据标准曲线所得出的样品浓度一定要再乘以其稀释倍数。

2. 半定量测定

2.1 目测半定量测定：首先选择一个适当的标准液与样品同运行，根据样品与标准品颜色深浅比较，判断样品浓度值是小于还是大于标准值。

2.2 仪器半定量测定：首先选择一个适当的标准液与样品同运行，根据样品与标准品吸光度值的高低比较，判断样品浓度值是小于还是大于标准值。

[注意事项]

1) 使用试剂盒前请仔细阅读说明书。

2) 不要使用过期试剂盒。

产品说明书

产品编号: NBE-236634

版本号: RN6.1



-
- 3) 试剂盒使用前, 将试剂恢复至室温 ($25\pm 2^{\circ}\text{C}$), 建议至少回温2小时。
 - 4) 标准品中含有可替宁(cotinine), 使用时应特别注意, 操作时应带手套。
 - 5) 终止液中含有硫酸, 使用时防止灼伤皮肤及腐蚀衣物。
 - 6) 不同标准品、样品所用吸头不能混用, 否则会影响试验结果。
 - 7) 不同批号试剂盒中的试剂不得混用; 不同标准品、样品所用吸头不得混用, 否则会影响实验结果。
 - 8) 稀释样本时必须用本试剂盒中的样本稀释液, 否则会影响实验结果。
 - 9) 混合试剂时应避免起泡。
 - 10) 本试剂盒检测为阳性的样品应该用另一种方法如HPLC或GC/MS加以确证。