

# **酶联免疫试剂盒检测通则**

(征求意见稿)

编制说明

标准起草组

**2023 年 10 月**

# 国家标准《酶联免疫试剂盒检测通则》编制说明

## 一 任务来源

根据国家化标准管理委员会文件[2019]22号《国家化标准管理委员会关于下达2019年第二批推荐性国家标准计划的通知》，项目编号为：20192274-T-424的“酶联免疫分析试剂盒检测通则”列入2019年推荐性国家标准的制修订计划。

本标准由中国标准化研究院归口。

本标准由江南大学、中国计量大学、中国标准化研究院等单位起草。

## 二 标准制定的目的和意义

酶联免疫试剂盒，是指能完成酶联免疫吸附测定（enzyme linked immunosorbent assay, ELISA）必需试剂和器材的集合，其检测原理是将一定浓度的抗原或者抗体通过物理吸附的方法固定于聚苯乙烯微孔板表面，加入待检标本，通过酶标物显色的深浅间接反映被检抗原或者抗体的存在与否或者量的多少。其具有检测通量高、操作简单、快速等特点，适于现场检测使用，被广泛应用于医学、食品、农业、生化等检测领域，市场上常用的有细胞因子、趋化因子和生长因子ELISA试剂盒、免疫肿瘤学ELISA试剂盒、神经生物学ELISA试剂盒、牛孕酮ELISA试剂盒、葡萄糖-6-磷酸酶活性检测ELISA试剂盒以及抗生素残留、农药残留、真菌毒素等各类ELISA试剂盒等。

随着ELISA检测技术的普遍应用，相关标准的制定也随之增多。根据国家标准网的检索结果可知，现有采用ELISA检测方法的国家标准共有20项（表1），行业标准34项，地方标准35项；主要是针对某种特定目标物（真菌毒素、农兽药、微生物等）ELISA检测方法的规定。此外，有《酶免疫检测抗体检测通则》（GB/T 40265-2021）规定了酶免疫检测抗体检测的一般要求、检测过程和结果表述，适用于酶免疫检测用抗体的检测控制，不适用于具有标记物的酶免疫检测用抗体的检测控制。另有1项《酶联免疫分析试剂盒通则》（GB/T 33411-2016），其规定了酶联免疫分析试剂盒的技术要求、检验方法、使用说明书和标签，适用于小分子化合物检测用的酶联免疫分析试剂盒；该标准属于ELISA试剂盒产品通则，除适用范围不适用于大分子化合物检测的试剂盒外，其主要对试剂盒的组成及要求、标准曲线的线性、灵敏度、定量限、精密度以及正确度等进行了规定，缺乏对检测样品、检测过程以及参比方法一致性等检测要求相关的规定。此外，卫生部标准WS/T 124-1999《临床化学体外诊断试剂盒质量检验总则》对临床用化学体外诊断试剂盒质量规定了技术要求；2005

年，我国农业部对兽药残留检测的免疫试剂盒有官方注册（备案）管理要求，出台了《关于加强兽药残留检测试剂（盒）管理的通知》（农办医[2005]3号），制定了《兽药残留酶联免疫试剂（盒）备案审查技术资料要求》和《兽药残留试剂（盒）备案参考评判标准》，对兽药残留检测试剂（盒）进行管理。国家食品药品监督管理局标准YY/T1183-2010《酶联免疫吸附法检测试剂》对在医学实验室用酶联免疫试剂盒规定了通用技术要求；2011年，原国家质量监督检验检疫总局发布了SN/T 2775-2011《商品化食品检测试剂盒评价方法》规定了用于食品检测的商业化检测试剂盒评价方法的通用要求，适用于商品化食品检测试剂盒生产企业、用户及第三方机构在生产或使用商品化食品检测试剂盒对相关技术指标进行评价，其中对商品化食品试剂盒的包装、评价实验室以及评价方法给出了具体要求；评价指标包括线性和范围、检测限、定量限、正确度、特异性、精密度、耐变形以及与参考检测方法的比较，具体评价方法中将与参考检测方法的比较纳入正确度的指标中。食药监办械函[2013]3号公示了《酶联免疫法检测试剂注册技术审查指导原则》，主要针对酶联免疫类检测试剂的主要原材料、生产工艺及反应体系、产品质量控制等环节提出指导性技术要求。

表1. 现有关于ELISA检测方法的国家标准

序号	标准编号	标准名称
1	GB 5009.22-2016	食品安全国家标准 食品中黄曲霉毒素B族和G族的测定 (第四法 酶联免疫吸附筛查法)
2	GB 5009.24-2016	食品安全国家标准 食品中黄曲霉毒素M族的测定 (第三法 酶联免疫吸附筛查法)
3	GB 5009.96-2016	食品安全国家标准 食品中赭曲霉毒素A的测定 (第四法 酶联免疫吸附测定法)
4	GB 5009.118-2016	食品安全国家标准 食品中T-2毒素的测定 (第二法 间接ELISA法，以及第三法 直接ELISA法)
5	GB/T 40368-2021	植物代谢产物胰蛋白酶抑制因子测定 酶联免疫吸附法
6	GB/T 40175.2-2021	纺织品 生物化学分析方法 第2部分：拟除虫菊酯类农药 (酶联免疫法)
7	GB/T 40175.3-2021	纺织品 生物化学分析方法 第3部分：有机磷类农药 (酶联免疫法)
8	GB/T 40220-2021	植物代谢产物大豆凝集素测定 酶联免疫吸附法
9	GB/T 40223-2021	植物代谢产物游离棉酚测定 酶联免疫吸附法
10	GB/T 32948-2016	犬科动物感染细粒棘球绦虫粪抗原的抗体夹心酶联免疫吸附试验检测技术
11	GB/T 17999.6-2008	SPF鸡 微生物学监测 第6部分：SPF鸡 酶联免疫吸附试验
12	GB/T 17480-2008	饲料中黄曲霉毒素B1的测定 酶联免疫吸附法

13	GB/T 22429-2008	食品中沙门氏菌、肠出血性大肠埃希氏菌O157及单核细胞增生李斯特氏菌的快速筛选检验 酶联免疫法
14	GB/T 21330-2007	动物源性食品中链霉素残留量测定方法 - 酶联免疫法
15	GB/T 21329-2007	动物源性食品中庆大霉素残留量检验方法 酶联免疫法
16	GB/T 21319-2007	动物源食品中阿维菌素类药物残留的测定 酶联免疫吸附法
17	GB/T 18932.28-2005	蜂蜜中四环素族抗生素残留量测定方法 酶联免疫法
18	GB/T 18932.27-2005	蜂蜜中泰乐菌素残留量测定方法 酶联免疫法
19	GB/T 18932.21-2003	蜂蜜中氯霉素残留量的测定方法 酶联免疫法
20	GB/T 14926.50-2001	实验动物 酶联免疫吸附试验

国外相关标准也主要以特定分析物的ELISA检测技术应用指南为主，如XP V03-147:2020《食品.真菌毒素的测定.酶免疫试剂盒微孔板 (ELISA试剂盒)的使用指南 (Foodstuffs - Determination of mycotoxins - Guide of use of immunoenzymatic kits microplate format (kits ELISA))》、NF V03-814\*NF EN 17254:2019《食品.酶联免疫吸附试验测定谷蛋白的最低性能要求(Foodstuffs - Minimum performance requirements for determination of gluten by ELISA)》、NF V03-054:2011《食品.用于食物过敏原检测的ELISA技术实施的良好实践指南 (Food products - Good practice guidance on implementation of ELISA techniques for food allergens detection)》、BS EN ISO 18330-2003《牛奶和奶制品.抗菌剂残留物检测用免疫分析或受体分析的标准化描述指南》和NF U47-019-2010《动物健康分析方法.酶联免疫吸附测定(ELISA)技术应用的良好实施指南 (Animal health analysis methods - Guide of good practices for implementation of ELISA techniques)》。2003年，国际标准化组织发布了《食品和饲料中微生物检测可替代方法验证规范》(ISO 16140: 2003)，是针对微生物快检方法的标准规范，为市场上的微生物相关快检产品的评价认证提供了非常好的依据；法国标准化协会在ISO 16140: 2003的基础上增加了实用性评价。1989年，国际分析化学师协会(AOAC)出台了针对检测试剂盒的指南：AOAC Research Institute Test Kit Definitions and Modifications Guideline，对检测试剂盒做了定义，没有形成评价标准。

ELISA试剂盒的生产企业也发展迅速，但在各类检测试剂盒的品种多样的情况下，并没有对适用于所有酶联免疫检测试剂盒的检测技术要求进行具体规定。因为ELISA测定过程中影响因素较多，对其操作中有一定的技术要求，在检测过程中除正常反应外，有时常见到一些错误的结果。引起ELISA测定错误结果的原因主要有：①标本因素，如血清样本稀释倍数不准确，可能产生很强的非特异性反应，造成假阴性或假阳性的结果；②试剂因素，ELISA检测的核心试剂为生物制品，如抗原、抗体、

酶标底物等，不同批次的生物制品质量有差异，同一批生物制品在不同保存时间和不同保存条件下的质量是不同的，即生物制品的性质具有可变性和易变性，易受各种因素的影响，如贮存温度以及恢复室温的时间等；③操作因素，如温育时间、比色时间、比色波长的选择等。如果没有完善的质量控制标准和方法，即使上等的ELISA试剂盒也有可能得出错误的结果，因此，需要对ELISA试剂盒检测的具体操作过程以及结果处理进行相关规定，这对于保证ELISA试剂盒适用对象进行正确的ELISA操作以及保证ELISA结果的准确度，具有重要的指导意义。

### 三 标准编制过程

1、2019年7月8日，国家化标准管理委员会文件[2019]22号《国家化标准管理委员会关于下达2019年第二批推荐性国家标准计划的通知》，项目编号为：20192274-T-424的“酶联免疫分析试剂盒检测通则”列入2019年推荐性国家标准的制修订计划。随后成立了标准研制小组。开始了标准方法的研究工作。

2、2020年1月至2020年12月，在前期的工作基础上，对不同检测对象同类试剂盒以及相关标准方法进行调研，确定ELISA试剂盒的检测指标，进一步完善标准文本。

3、2021年1月至2021年12月，选取不同类型的ELISA试剂盒，对相关的检测指标进行测试。

4、2022年1月至2022年11月，选取5家验证单位，分别对相应的检测指标进行验证测试，并根据检测指标的测试结果，形成征求意见稿。

### 四 标准编制原则和编制依据

在标准的制定过程中，严格贯彻国家有关方针、政策、法律和规章等，严格执行强制性国家标准和行业标准。与相关的各种基础标准相衔接，遵循了政策性和协调同一性的原则。

本标准的格式按GB/T 1.1-2020《标准化工作导则 第1部分：标准的结构和编写规则》要求，其技术内容参照WS/T 124-1999《临床化学体外诊断试剂盒质量检验总则》、GBT33411-2016《酶联免疫分析试剂盒通则》、GBT40369-2021《免疫层析试纸条检测通则》、GB/T 40265-2021《酶免疫检测抗体检测通则》、GBT20001.4-2015《标准规则编写-试验方法标准》、GB/T 27417-2017《合格评定 化学分析方法确认和验证指南》、农业部的兽药残留酶联免疫试剂（盒）备案参考评

判标准等要求，并结合酶联免疫分析试剂盒产品的特性进行编写的。在标准制订过程中力求技术内容的叙述正确无误；文字表达准确、简明、易懂；标准的构成严谨合理；内容编排、层次划分等逻辑与符合规定。

## 五 标准主要技术内容的确定

### 1. 适用范围

ELISA的基础是抗原或抗体的固相化及抗原或抗体的酶标记。结合在固相载体表面的抗原或抗体仍保持其免疫学活性，酶标记的抗原或抗体既保留其免疫学活性，又保留酶的活性。在测定时，受检标本（测定其中的抗体或抗原）与固相载体表面的抗原或抗体起反应。用洗涤的方法使固相载体上形成的抗原抗体复合物与液体中的其他物质分开。再加入酶标记的抗原或抗体，也通过反应而结合在固相载体上。此时固相上的酶量与标本中受检物质的量呈一定的比例。加入酶反应的底物后，底物被酶催化成为有色产物，产物的量与标本中受检物质的量直接相关，故可根据呈色的深浅进行定性或定量分析。由于酶的催化效率很高，间接地放大了免疫反应的结果，使测定方法达到很高的敏感度。

ELISA测定可具有多种形式，大致分为四种主要的不同类型：直接法、间接法、竞争法、夹心法，如图1所示。①直接ELISA。将抗原固定于多孔板表面，用特定于该抗原并且直接偶联到HRP或其他检测分子的抗体检测。②间接ELISA。与直接ELISA测定相似，将抗原固定于多孔板表面。但是，检测需要两步过程，通过该过程先将特定于该抗原的一抗结合到靶标，然后将针对一抗的宿主物种的标记二抗与一抗结合进行检测。该方法还可用于通过血清代替一抗来检测血清样品中的特定抗体。③夹心ELISA。夹心ELISA式最常用的形式。这种形式需要特定于该抗原的不同表位的两种抗体。这两种抗体通常被称为匹配抗体对。其中一种抗体包被于多孔板表面上并用作捕获抗体以促进抗原的固定。另一种抗体被偶联并促进抗原的检测。④竞争ELISA。该方法通过检测信号干扰测量抗原浓度。前三种形式都适用于竞争形式。样品抗原与参考抗原竞争结合到特定量的标记抗体。参考抗原预包被于多孔板上。将样品用标记抗体预孵育并加入孔中。根据样品中抗原的量，将有更多或更少的游离抗体可用于结合参考抗原。样品中的抗原越多，检测到的参考抗原就越少，信号就越弱。也有一些竞争ELISA试剂盒使用标记抗原代替标记抗体。标记抗原和样品抗原（未标记）竞争结合到一抗。样品中抗原的量越少，则因孔中的更多标记抗原产

生的信号就越强。

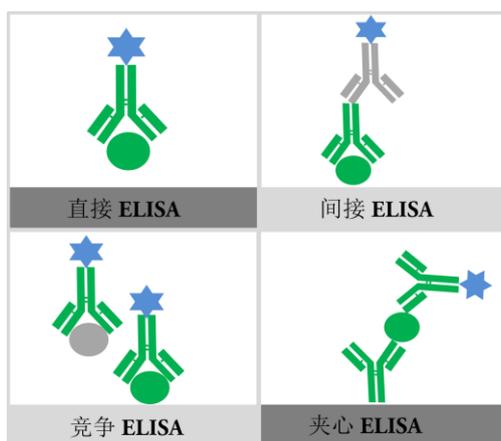


图1. 四种不同类型的ELISA

在商品化试剂盒中用的比较多的是双抗体夹心法和间接竞争法，其中双抗体夹心法多用于大分子化合物检测，如致敏蛋白、细胞因子、病毒等；间接竞争法多用于小分子化合物检测，如农兽药、抗生素等。

收集整理不同类型ELISA试剂盒说明书及标准，了解不同ELISA试剂盒的组成要求、外观、贮存条件等一般要求、以及样品处理、检测步骤、检测指标、结果计算等检测过程等；同时，解读不同类型ELISA检测方法的标准，从方法学的角度分析不同类型ELISA的技术要求。通过分析总结，综合性地提出ELISA试剂盒检测的相关要求。

本文件规定了ELISA试剂盒的一般要求、检测过程和检测报告，适用于ELISA试剂盒的检测。

## 2、检测指标的选择

商业化的ELISA试剂盒均附有产品说明书，小分子化合物以25羟基维生素D检测试剂盒（酶联免疫法）说明书（附件1）为例，说明书文件内容包括以下几个部分：

（1）产品名称；（2）包装规格；（3）概要说明；（4）检测原理；（5）试剂盒的主要组成成分：酶标板、标准品等；（6）储存条件及有效期；（7）样本要求；（8）检验方法：自备材料、试剂制备、操作步骤；（9）参考值；（10）检测结果的解释：样本分析数据、典型标准曲线；（11）产品性能指标：精确度、灵敏度、精密度、回收率、线性、特异性；（12）参考文献；（13）生产企业及售后服务单位、批准号等。大分子化合物以人TNF- $\alpha$  ELISA试剂盒为例（附件2），该说明书内容包括：

（1）产品名称；（2）储存和稳定性；（3）试剂盒提供的材料；（4）试剂盒未提

供但需用到的材料：酶标仪、去离子水等；（5）试剂制备：洗液、抗体稀释、标准品等；（6）样品制备；（7）酶标板准备；（8）测定步骤；（9）方法特异性；（10）交叉反应；（11）物种特异性；（12）标准曲线、计算以及典型标曲数据；（13）典型样本值：灵敏度、回收率、线性稀释、精密度（包括批内和批间）。

由上可知，ELISA试剂盒应附产品说明书，或等同的指导性文件。文件内容应至少包括以下部分：（1）品种名称（中英文）；（2）测定原理；（3）适用范围，提及检测的目标物和适用的基质范围；（4）适用单位需自备的设备和试剂：酶标仪、去离子水等；（5）提供的材料和试剂：酶标板、样本稀释液、洗涤缓冲液、底物、终止液、质控样品等；（6）溶液配制方法；（7）样品前处理方法；（8）详细的检测步骤或操作指南；（9）结果判定；（10）分析质量参数：灵敏度、检测范围、回收率、精密度、特异性；（11）保存条件和有效期。

根据上述ELISA试剂盒说明书，ELISA试剂盒的检测指标主要包括标准曲线线性、灵敏度、精密度、回收率、特异性；另外为保证食品快速检测方法评价工作科学合理、标准统一，我国于2017年发布了《食品快速检测方法评价技术规范》，除灵敏度、特异性外，参比方法的一致性分析也作为其中一项评价指标。回收率以及与参比方法的一致性均属于定量方法的正确度指标。因此，本文件中的ELISA试剂盒的检测指标为：曲线线性、灵敏度、精密度、准确度、特异性，其中与参考方法的一致性包含在正确度指标中。

### 3、检测过程

#### 3.1 检测样本的选择和制备

检测样本需使用盲样进行，检测用盲样涉及空白、阴性、阳性样品，其中空白或阴性样本为与待测物具有同源性和同质性但不含有或方法学灵敏度未能检出待分析物的样品，阳性样本为在阴性样品中添加待分析物的方式制备或自身含有待分析物的实际样品。这些样本均需选择适宜的仪器检测方法测定样品中的目标分析物含量，可使用有证标准物质、参考物质或质量控制品进行溯源参考，测定完成后的各类样品应进行随机编号处理，形成盲样，可自行制备。应符合以下要求：

（1） 阴性样品与待分析样品应来源于同一物种，并具有相似的结构特性，包括不含有或方法学未能检出目标分析物的样品，以及含有或添加其他与目标分析物结果类似物质（易产生交叉反应）的样品，按酶联免疫试剂盒说明书的步骤进行前

处理。

(2) 阳性样品为通过在阴性样品中添加目标分析物所制备的样品，按酶联免疫试剂盒说明书的步骤进行前处理。

(3) 阴性样品和阳性样品应具有基质符合性，以及与实际样品所含除目标分析物外其他成分的相似性，重点考虑典型样品基质或相似基质，综合考虑蛋白、脂肪、水分、糖分、高聚物或多聚体物质、色泽、酸碱性等影响检测的组分进行区分选择。

(4) 对于多种目标分析物的检测，尽可能对全部目标分析物进行检测，若因客观条件限制不能检测全部目标分析物，宜对所有目标分析物进行分类（如结构类似程度、危害程度等），每一类至少选择一种目标分析物进行检测。

### 3.2 试剂准备

ELISA 试验的原材料主要有抗原、抗体以及酶标抗体等生物活性物质，故市场上的大部分ELISA试剂盒的储存条件为2-8℃。温度是ELISA结合反应的重要影响因素。为了使所有样本在一致的温度下反应，实验前务必将所有试剂包括检测样本，从冷藏环境中取出，放置15-30分钟平衡至室温，以避免因温度的动力学反应差异而导致ELISA检测结果的不准确。

部分标准品如肿瘤坏死因子超家族15等蛋白类需要保存在-20℃，恢复室温后，还需要采用标准稀释液，进行梯度稀释，配制成系列测定使用的浓度，未用完的标准品应按照一次用量分装后，将其放在-20℃贮存，一次性使用，避免反复冻融。

抗体工作液需要按照一次计算所需使用的量，采用抗体稀释液进行稀释，现用现配；酶结合物工作液用酶结合物稀释液进行稀释配制；洗涤液通常需要用蒸馏水进行稀释。

### 3.3 操作准备

按照3.2中准备工作配制好各种溶液，根据待测样本数量、系列标准溶液的数量决定所需的酶标板板条数，并增加空白对照孔；分别将样本和不同浓度的标准品加入相应孔中（零孔中只加样本稀释液），然后按照ELISA试剂盒说明书，依次进行孵育、洗板、显色、终止、测试等步骤进行操作。为确保检测结果的准确度，每个样本及标准溶液重复测定2次或3次，并记录实际加样情况。

此外，一般ELISA试剂盒中有以下操作要点提示：（1）配制各种试剂时要充分混匀，以避免加样时加入大量气泡，产生加样误差；（2）为避免交叉污染，在加入

不同浓度的标准品、不同样品、不同试剂时及时更换吸头；（3）在每次孵育前需使用新封板胶纸封住反应孔；（4）显色剂在添加之前，应确保无色，不能使用已经变色的显色溶液；（5）每次检测均需要做标准曲线，根据样品待测因子的含量，适当稀释或浓缩样本，做好预实验。进行规范操作，确保检测结果的准确性。

### 3.4 结果计算

#### 3.4.1 标准曲线

ELISA试剂盒定量分析的结果计算是建立在标准曲线基础上。已知系列标准品的浓度以及对应浓度下酶标仪测定的吸光度值，通过曲线拟合得到相应的标准曲线，外推标准曲线的线性部分计算样品中目标物的浓度。

在ELISA检测中允许使用四种模型绘制标准曲线。（1）**线性图**的一个坐标轴表示抗原的浓度，另一个表示读数。 $R^2$  值在此通常用于确定拟合，数值大于 0.99 表示拟合非常好。然而，线性图往往会压缩曲线下端上的数据点，导致计算结果不准；

（2）**半对数图**即将浓度值取对数值，然后再和对应的OD值进行直线回归，理想的状态下，在半对数坐标中是一条直线，常用于浓度随着OD值的增加或者减低呈对数增加或者减少的情况，即浓度的变化比OD值的变化更为剧烈。在ELISA实验中较常用（有很多用EXCEL画图时，也常使用半对数），拟合函数方程式为： $y = a \lg(x) + b$ ，

**半对数图**可以帮助抵消线性图引起的下端压缩。半对数图使用浓度的对数与读数的关系。这种方法通常会得到数据点分布更均匀的 S 形曲线。（3）**对数/对数图**即log-log拟合回归方程，与半对数相似，只是将OD值和对应的浓度值均取对数，然后再进行直线回归，拟合函数方程式为： $\lg(y) = a \lg(x) + b$ ；该拟合可以为低到中浓度范围提供良好的线性，但范围的高端则容易失去线性。（4）**log—logit直线图**拟合，可用于竞争法。Logit 变换源于数学中的 Logistic 曲线，在ELISA中，当竞争性反应物为 0 时结合率为 100%，如果某一浓度下结合率为 B， $B=OD/OD_0$ ，在对B进行 Logit 变换：

$y=\ln[B/(1-B)]$ ，之后y与浓度的对数成线性关系，即： $y = a + b \lg(x)$ ，拟合函数方程式为： $\lg(y) = a \lg(x) + b$  就得到了Logit-log 直线回归模型，这个模型一般适用于竞争法的拟合，所以拟合时要求只有少有一个零浓度测试的OD值，并且此值为整个反应的最大值(也就是我们常说的至少要做个空白对照)。（5）**四参数拟合回归**

不仅限于竞争法，实际上夹心法也可以用它。根据情况，可能是一个单调上升的类似指数，对数，或双曲线的曲线，也可能是一个单调下降的上述曲线，还可以是一条 S

形曲线。它要求 X 值不能小于0（因为指数是实数，故有此要求）。在很多情况下它都可以拟合 ELISA 的反应曲线，也是目前国际上最流行的免疫检测拟合方式。较其他拟合方式，四参数拟合对曲线的全部都有较好的适用性，因此在本标准中推荐使用。

根据GBT 32465-2015 《化学分析方法验证确认和内部质量控制要求》和GB/T 27147-2017 《合格评定 化学分析方法确认和验证指南》，校正标准曲线浓度应均匀布置6个及以上，每个浓度测定次数不少于2次，最好是3次或更多，对于准确定量的方法，线性回归方程的相关系数不低于0.99。采用ELISA试剂盒说明书进行测定，得到对应标准品浓度的吸光度值。以吸光度值为纵坐标，以标准品浓度为横坐标，采用软件进行四参数拟合，四参数方程的拟合函数表达式为：

$$y = d + \frac{a - d}{1 + \left(\frac{x}{c}\right)^b} \dots\dots\dots (1)$$

在这个方程中，“a”和“d”分别表示吸光度的最大值和最小值，代表S型曲线的上渐近线。“c”为吸光度增长速度开始发生变化的浓度值，即半效反应浓度，表示拐点即曲线的中点，“b”为吸光度增加速率参数，相当于曲线在“c”处的斜率。根据这个方程，我们现在可以反算出一个样本的未知浓度。

随着计算机软件不断发展，采取合适的匹配的软件来对数据进行四参数拟合变得更为重要。如大多数的中高端酶标仪都会配备带有数据收集和处理软件，如Softmax Pro，只需编制好相应的模板，即可自动获得拟合图和计算结果，更新版的软件还可以完成平行性检验等更高阶的功能。但这些相应软件的授权需要购买，且价格较高。因此，在日常数据的处理中，也会使用一些统计软件如Origin、GraphPad Prism来进行四参数拟合，但这些软件不具备常用的96孔板布局功能，需要前期在Excel中计算吸光度平均值、设置标准品和样品浓度等，因此在使用上是存在一定的限制。

而在定量分析中，可以推荐使用国产分享软件mELISA进行处理，其具有96孔板的排布方式，对于含量计算、平行样变异系数计算、标准曲线拟合和质控样品回收率计算都有着极好的效果。另外一些国产的免费软件也可以实现四参数拟合和计算功能，如ELISACalc，但其也需要前期在Excel中进行平均值计算、标准曲线浓度设置等工作。但这些软件在应用于通过多条曲线比较（如EC<sub>50</sub>比较来计算相对活性等）

的工作中操作较为繁琐。

### 3.4.2 数据计算

由未知样的吸光值和标准曲线可换算得出相应的浓度。如果样本的吸光度值超出标准曲线的上限，应在实验前适当稀释样本以获得精确结果。在分析数据时，样本实际浓度应为标准曲线上获得的浓度乘以稀释倍数。

### 3.4.3 灵敏度

GB/T 27147-2017 《合格评定 化学分析方法确认和验证指南》中定义3.16指出灵敏度是测量系统的示值变化除以相应被测量的量值变化所得的商。灵敏度可表示为检出限（LOD）和定量限（LOQ），LOD是指由给定测量程序获得的测得的量值，其对物质种不存在某种成分的误判概率为 $\beta$ ，对物质中存在某种成分误判概率为 $\alpha$ ，国际理论化学和应用化学联合会推荐 $\alpha$ 和 $\beta$ 的默认值为0.05，检出限往往分为方法检出限和仪器检出限。LOQ是指分析方法可定量测定样品中待测组分的最低浓度或最低量，应满足一定的精密度和准确度的要求。与LOD相类似，LOQ也可以分为两个部分，仪器定量限和方法定量限，该指标体现了分析方法是否具备灵敏的定量检测能力，以保证含量很少的成分能够被准确测出。LOQ的确定主要从其可信性考虑，通常建议将空白值加上10倍的重复标准偏差作为LOQ，也可以3倍的LOD或高于方法确认中使用最低加标量的50%作为LOQ，如为增加数据的可信性，也可用10倍的LOD来表示。特定的基质和方法，其LOQ可能在不同实验室之间或在同一个实验室内由于使用不同设备、技术和试剂而有差异。

检测限的计算和表达方法较多，包括空白标准偏差法、信噪比法、逐步稀释法、仪器灵敏度法、方法分辨率法、检测能力计算法等，同一个检测指标不同的检出限表达结果差异可能会达到几个数量级。根据大多数市售ELISA试剂盒说明书，ELISA定量分析方法通常采用空白标准偏差法评估检出限，即通过分析大量的样品空白或加入最低可接受浓度的样品空白来确定LOD，独立测试的次数应不少于10次，通过标准曲线计算出检测结果的平均值（ $\bar{x}_0$ ）和标准偏差（s）。试剂盒的检出限确证，可用95.4%可信限计算。结合ELISA试剂盒说明书描述，对于竞争ELISA试剂盒，分别以 $\bar{x}_0-2s$ 和 $\bar{x}_0-10s$ 表示LOD和LOQ；对于夹心ELISA试剂盒，分别以 $\bar{x}_0+2s$ 和 $\bar{x}_0+10s$ 表示LOD和LOQ。由于每一品种中的关键试剂抗原、抗体或标记物的不同，在产品的开发测试中加以优化，其具体检测试剂盒的灵敏度会有不同。本标准通过

计算10份空白基质测定均值加减2倍（或3倍）标准差表述，以此数值通过标准曲线计算出相对应的浓度，确认大于或等于标准曲线中最低浓度，即为LOD（LOQ）。

#### 3.4.4 精密度

根据GB/T 6379.1-2004/ ISO 5725-1:1994《测量方法与结果的准确度（正确度与精密度）第1部分：总则与定义》，精密度通常是指在规定条件下互相独立的测试结果之间的一致程度，表示测量的重复性和再现性，是保证准确度的先决条件，但是高的精密度不一定能保证高的准确度。检验统计学中，用标准差和变异系数表示测定的精密度。变异系数（CV）被定义为标准差与其均值的比值，以百分数表示，变异系数越大的样本，其测定值的精密度越低。依据测定值与分析的关系，精密度可分为批内精密度和批间精密度，分别以批内变异系数和批间变异系数表示。批内变异系数指同一次分析中同一样品平行测定值的重复性，批间变异系数指同一样品在不同批次分析中测定值的再现性。因此精密度是考察试剂盒对同一样本重复测定时能否得到相同实验结果的指标，是评价试剂盒质量控制的重要内容。批内精密度是指在同一实验室，由同一操作员使用相同的设备（在同一块微孔板上），按相同的测试方法，在短时间内对同一被测对象相互独立测定结果间的一致程度。批间精密度是指在不同实验室，由不同的操作员使用不同的设备，按相同的测试方法，对同一被测对象进行独立测定结果间的一致程度；批间精密度包含内容有：同一试剂盒，不同批次之间；同一试剂盒，同一批次，不同实验室之间；同一试剂盒，同一批次，同一实验室，不同操作者之间；同一试剂盒，同一批次，同一操作者，有效期内不同时间之间等的重复检测结果。

根据GB/T 27404-2008《实验室质量控制规范 食品理化检测》，对于食品中的禁用物质，精密度实验应在方法测定低限、两倍方法测定低限和十倍方法测定低限进行三水平试验；对于已制定MRL的，精密度实验应在法测定低限、MRL、选一合适点进行三水平试验；对于未制定MRL的，精密度实验应在方法测定低限、常见限量指标、选一合适点进行三水平试验。重复测定次数至少为6。实验室内部的变异系数参考范围见表1。

表1. 实验室内变异系数

被测组分含量	实验室内变异系数 (CV) /%
0.1 μg/kg	43
1 μg/kg	30
10 μg/kg	21
100 μg/kg	15
1 mg/kg	11
10 mg/kg	7.5
100 mg/kg	5.3
1000 mg/kg	3.8
1%	2.7
10%	2.0
100%	1.3

GB/T 26124-2011《临床化学体外诊断试剂盒》规定临床化学体外诊断试剂盒规定批间差和批内差应符合生产企业规定的要求。北京市食品药品监督管理局发布的《化学发光免疫类体外诊断试剂（盒）产品技术审评规范》（2017版）中，（1）重复性：用控制物质或人源样本（高、低浓度）测试试剂（盒），重复测试至少10次（ $n \geq 10$ ），分别计算测量值的平均值和标准差，计算变异系数，变异系数应不大于10%。（2）批间差：用三个不同批号试剂（盒），对不同浓度的样本分别重复测定10次，计算每份样本10次测定结果的变异系数，变异系数应不大于15%。

综上，本标准中规定对ELISA试剂盒的精密度的要求如下：使用同一批次的试剂盒，选取低、中、高3个浓度水平阳性样本重复测定10次，按照下列公式计算得到批内变异系数。使用不同批次的同一试剂盒，选取低、中、高3个浓度水平阳性样本重复测定10次，按照下列公式计算得到批间变异系数。

$$CV = \frac{s}{\bar{x}} \times 100\% \dots\dots\dots (2)$$

式中：

CV — 变异系数；

s — 标准偏差；

$\bar{x}$  — 10次重复测定的平均值。

### 3.4.5 正确度

测量结果的正确度用于表述无穷多次重复性测定结果的平均值与参考值之间的接近程度，正确度差意味着存在系统误差，通常用偏差表示。而测量结果的偏差则通过回收试验进行评估。

评估正确度的样品应尽可能包括天然存在样品、含有残留物质或受污染的样品进行回收率测定。最理想的偏差评估是利用样品的基质匹配且浓度相近的有证标准物质（CRMs）进行测试，如果合适的CRMs无法获得，也可采用分析参考物质（RM）来进行评估；特别是对于目标分析物以结合态形式存在待测物中（如克伦特罗与动物基体结合）。对于稳定性高且以原药自身形式存在的目标分析物，也可通过在已确认的空白样品中加入标准品。若无法获得空白样品，也可向含有痕量分析物的样品中加入标样，亦可通过加标样品前后之差进行计算。

根据GB/T 27404-2008 《实验室质量控制规范 食品理化检测》，控制样品中被测组分的含量应尽量与被测样品相近，若被测样品为未检出，则控制样品中被测组分的含量应在方法测定低限附近。测定结果的回收率应符合以下要求：（1）对于食品中的禁用物质，回收率应在方法测定低限、两倍方法测定低限和十倍方法测定低限进行三水平试验；（2）对于已制定最高残留限量（MRL）的，回收率应在法测定低限、MRL、选一合适点进行三水平试验；（3）对于未制定MRL的，回收率应在方法测定低限、常见限量指标、选一合适点进行三水平试验。回收率的参考范围见表1。另外，在《食品快速检测方法评价技术规范》中指出实验中测试样品的“测试水平一般应包括标准方法检出水平（或者标准限量值）的0.5、1、2倍水平或者其他可检测区分的水平（不少于3个）；或者方法标称检出限0.5、1、2倍水平或者其他可检测区分的水平（不少于3个）”。由此可知，回收率的测试水平应至少包含低、中、高三个浓度水平。

表 2. 回收率范围

浓度水平范围 mg/kg	回收率范围 %
>100	95-105
1-100	90-110
0.1-1	80-110
<0.1	60-120

综上，本标准文本中分为与参比方法一致性、采用有证标准物质、以及回收率三

部分进行评估。分别如下表述。

(1) 与参比方法的一致性

采用试剂盒与已知的国际或国家认可的参考方法对同一份样本进行至少6次的测试，按GB/T 4889中的F检验和T-检验进行评价。

首先按照公式（3）进行F检验，考察酶联免疫试剂盒与已知的国际或国家认可的参考方法所取得的两组数据的标准偏差是否一致；若不一致，说明两组方法检测结果不一致；若一致，再按照公式（4）采用配对T检验，考察两组数据的平均值是否存在显著性差异，若不存在显著性差异，说明两种方法测定结构具有较好的一致性。

$$F = \frac{S_{大}^2}{S_{小}^2} \dots\dots\dots (3)$$

式中：

S大 一两组数据中标准偏差大的数值；

S小 一两组数据中标准偏差小的数值；

$$t = \frac{|\bar{x}_1 - \bar{x}_2|}{s} \sqrt{\frac{n_1 n_2}{n_1 + n_2}} \dots\dots\dots (4)$$

式中：

x1 第1组测定结果的平均值；

x2 第2组测定结果的平均值；

s 两组等精度测定结果的合并实验标准偏差；

n1 第1组测定的平行测定次数；

n2 第2组测定的平行测定次数。

其中，两组等精度测定结果的合并实验标准偏差s按公式（5）算：

$$s = \sqrt{\frac{(n_1 - 1)s_1^2 + (n_2 - 1)s_2^2}{n_1 + n_2 - 2}} \dots\dots\dots (5)$$

式中：

s1 第1组测定结果的标准偏差；

s2 第2组测定结果的标准偏差。

(2) 采用有证标准物质

对有证标准物质进行6次重复检测，计算6次重复检测的平均值、标准偏差和变异系数，按照公式（6）计算正确度。

$$\text{正确度}(\%) = \text{检测值} / \text{认定值} \times 100 \dots\dots\dots (6)$$

### (3) 回收率

选用试剂盒适用的每种基体，添加低、中、高3个浓度水平的目标分析物，每个水平至少测定6次，计算检测结果的平均值与理论值的偏差。3个浓度水平偏差的参考范围见表2。

### 3.4.6 特异性

特异性是指在样品中存在相关干扰物质的情况下，分析方法能够准确、专一地测定分析物的能力。ELISA试剂盒的检测是基于抗原抗体的反应进行的。由于被测样本中存在的某些与待测抗原/抗体有相似化学结构或抗原表位的分子，如易共存的其他抗原抗体、某些激素、易使用的药物等，可能与试剂中的单克隆抗体发生交叉反应而影响检测结果，因此，特异性也是ELISA试剂盒必不可少的检测指标。

特异性一般用交叉反应率表示。对于夹心ELISA的检测，交叉反应率一般是指一定浓度的结构类似物在该试剂盒上的测定结果（物质的量）与该类似物的量的比值的百分率，比如1000 pmol/L的结构类似物，在某试剂盒上的测定结果是5 pmol/L，其交叉反应率为5除以1000再乘以100%，即0.5%。其特异性包括种属特异性和方法特异性，种属特异性指ELISA试剂盒中的抗体只对某一物种的组织、细胞、血清、体液、或分泌物发生特异反应的特性，而对其他种属动物的蛋白均不发生反应，如人源p21 ELISA试剂盒与鼠源p21的交叉反应率应小于3%，

对于竞争法ELISA的检测，通常采用竞争抑制试验测定，按照3.4.1，用不同浓度的结构类似物和标准品分别做竞争抑制曲线，计算得到相应的IC<sub>50</sub>（半数抑制浓度），按照公式（3）计算交叉反应率。

$$CR = \frac{\text{目标物的} EC_{50}}{\text{类似物的} EC_{50}} \times 100\% \dots\dots\dots (3)$$

式中：

CR — 交叉反应率，%；

EC<sub>50</sub> — 半数抑制浓度，根据标准曲线计算得到。

## 六 应用试验

选取不同类型的ELISA试剂盒，按方法可为间接法和夹心法，按检测化合物种类可分小分子物质和大分子物质。分别选取卡那霉素ELISA试剂盒和牛乳铁蛋白ELISA试剂盒，按照ELISA试剂盒说明书进行操作（附件3和附件4），对标准曲线线性、灵

敏度、精密度、正确度、特异性等检测指标进行考察，以证明该标准草案适用于酶联检测试剂盒的检测。

### 1、小分子化合物应用示例 卡那霉素ELISA试剂盒

所有试验按产品说明书进行检验操作，所有试验方案按标准规定执行。

#### (1) 标准曲线线性

按照卡那霉素说明书，将6个标准品浓度，各平行测定3次，得到表3。

表3. 卡那霉素试剂盒的标准曲线

ng/mL	1	2	3	平均值	标准偏差
0	1.373	1.258	1.283	1.305	0.061
0.5	1.089	1.012	0.883	0.995	0.104
1.5	0.793	0.687	0.799	0.760	0.063
4.5	0.554	0.557	0.590	0.567	0.020
13.5	0.421	0.406	0.368	0.398	0.027
40.5	0.277	0.266	0.251	0.264	0.013

使用origin软件进行logistic四参数曲线拟合，得到如下标准曲线（图2）。

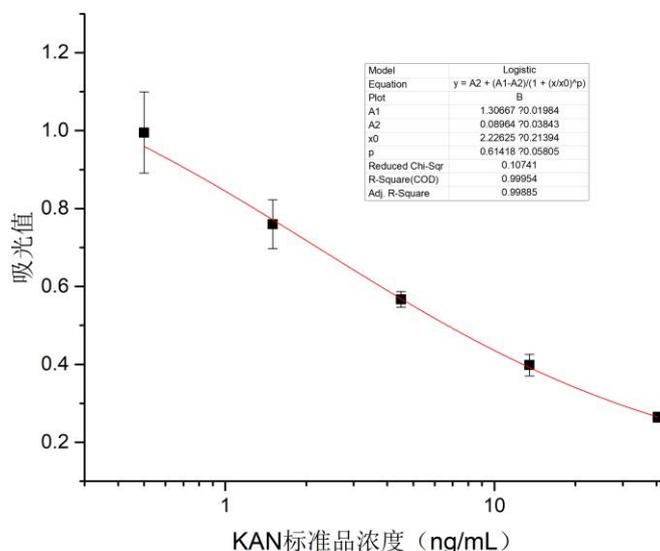


图2. 卡那霉素的标准曲线

#### (2) 检出限和定量限

市场上购买奶粉样本，并经LC-MS/MS鉴定为氨基糖苷类（卡那霉素、新霉素、潮霉素B和庆大霉素）阴性样本，详细测定结果见附件5。

将空白奶粉样本按照ELISA说明书的操作程序，平行测定10次，分别计算平均值和标准偏差，平均值加3倍的标准偏差即为检出限，平均值加10倍的标准偏差即为定

量限。具体数据如表4所示。

表4. 卡那霉素试剂盒的检出限和定量限

测定次数	吸光值	由标曲得到的计算浓度 (ng/mL)	乘以 30 倍得到奶粉中 KAN 的浓度 (μg/kg)	平均值 (μg/kg)	标准偏差 (μg/kg)	检出限 (μg/kg)	定量限 (μg/kg)
1	0.957	0.516	15.466	16.022	0.441	17.35	20.43
2	0.953	0.550	16.489				
3	0.959	0.517	15.507				
4	0.952	0.548	16.431				
5	0.957	0.521	15.644				
6	0.956	0.523	15.704				
7	0.951	0.534	16.025				
8	0.960	0.529	15.885				
9	0.950	0.551	16.543				
10	0.953	0.551	16.529				

### (3) 精密度

选取卡那霉素标准品的添加浓度分别为 25、50、150 μg/kg。

#### A. 批内精密度

在同一测定中，平行测定 10 次，分别计算平均值、标准偏差以及变异系数。如表 5 所示。

表 5. 卡那霉素试剂盒的批内精密度

添加浓度 (μg/kg)	1	2	3	4	5	平均值 (μg/kg)	标准偏差 (μg/kg)	变异系数(%)
25	20.97	27.26	25.78	20.59	25.02	24.70	3.064	12.40
	24.75	28.15	29.55	22.89	22.03			
50	43.47	56.30	51.42	50.24	47.59	49.85	5.293	10.62
	47.70	42.38	58.64	46.92	53.85			
150	141.21	149.83	149.94	169.09	145.29	152.25	9.519	6.25
	145.68	153.67	143.84	166.72	157.28			

#### B. 批间精密度

在三次测试中，每次测试 3 个平行，分别计算平均值、标准偏差以及变异系数。如表 6 所示。

表 6. 卡那霉素试剂盒的批间精密度

添加浓度 (μg/kg)	1	2	3	平均值 (μg/kg L)	标准偏差 (μg/kg)	变异系数(%)
25	27.50	30.40	24.09	24.89	3.36	13.48

	21.97	25.62	26.44			
	26.78	20.63	20.53			
50	43.47	56.30	51.42	50.53	5.83	11.54
	54.35	53.88	47.85			
	44.88	43.50	59.13			
150	141.21	149.83	149.94	155.70	11.51	7.39
	156.64	149.81	155.19			
	174.48	174.57	149.59			

#### (4) 正确度

通过添加回收实验进行准确度测试，卡那霉素标准品的添加浓度分别为 10、50、150  $\mu\text{g}/\text{kg}$ ，平行测定 10 次，分别计算平均值和回收率。具体数据见表 7。

表 7. 卡那霉素试剂盒的正确度测试

添加浓度 ( $\mu\text{g}/\text{kg}$ )	1	2	3	4	5	平均值 ( $\mu\text{g}/\text{kg}$ )	回收率(%)
25	20.97	27.26	25.78	20.59	25.02	24.70	98.80
	24.75	28.15	29.55	22.89	22.03		
50	43.47	56.30	51.42	50.24	47.59	49.85	99.70
	47.70	42.38	58.64	46.92	53.85		
150	141.21	149.83	149.94	169.09	145.29	152.25	101.50
	145.68	153.67	143.84	166.72	157.28		

#### (5) 特异性

选取氨基糖苷类抗生素包括链霉素、潮霉素 B、新霉素和庆大霉素，按照公式 (3) 计算交叉反应率，结果表 8 所示。

表 8. 卡那霉素试剂盒的特异性

化合物	$\text{IC}_{50}$ (ng/mL)	CR, %
卡那霉素	2.23	100
潮霉素 B	>1000	<0.5
新霉素	>1000	<0.5
庆大霉素	>1000	<0.5

## 2、大分子化合物应用示例 牛乳铁蛋白ELISA试剂盒

所有试验按产品说明书进行检验操作，所有试验方案按标准规定执行。

#### (1) 标准曲线线性

按照ELISA试剂盒的说明书，配制系列浓度的标准品，每个浓度平行测定3次，具体如表9所示。

表9. 乳铁蛋白试剂盒的标曲线性

标准品浓度 (ng/mL)	1	2	3	平均值 (ng/mL)	标准偏差
0	0.139	0.136	0.131	0.135	0.004
6.25	0.286	0.364	0.391	0.347	0.055
12.5	0.496	0.488	0.467	0.484	0.015
25	0.908	0.943	0.859	0.903	0.042
50	1.562	1.579	1.537	1.559	0.021
100	2.161	2.252	2.285	2.233	0.064
200	2.638	2.676	2.608	2.641	0.034

使用origin软件进行logistic四参数曲线拟合，得到如下标准曲线（图3）。

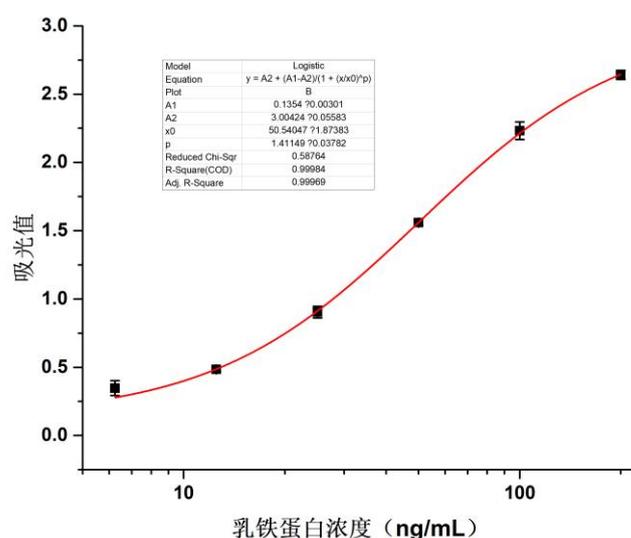


图3. 乳铁蛋白试剂盒的标准曲线

## (2) 检出限和定量限

乳铁蛋白是母乳的核心免疫蛋白，人乳中乳铁蛋白浓度约为1.0~3.0 mg/L，是牛乳中的10倍（牛乳中含量为0.02~0.35 mg/mL）。为提高婴幼儿的免疫力，市场上的配方奶粉大多有乳铁蛋白的添加，经调查可知绝大部分品牌奶粉的乳铁蛋白含量在30~50 mg/100g，美赞臣的蓝臻系列中乳铁蛋白含量明显要高出其他的8-10倍。另外，皇家美素佳儿的乳铁蛋白含量与蓝臻相当。

由图3标曲可知，该试剂盒的检测灵敏度（EC<sub>20</sub>）为22.05 ng/mL。一般全脂奶粉和水的比例大约是1:6兑成纯牛奶，经过换算可知，乳粉中乳铁蛋白的检测范围约为6.17~69.43 mg/100g。故在实际乳粉需要稀释至少2倍进行检测。

在中国乳品工业2019年第47卷第4期《不同类型热处理方式对牛乳品质的影响》中显示，巴氏杀菌中乳铁蛋白含量最低为12mg/L、最高为38mg/L，即巴氏杀菌乳中

乳铁蛋白含量约为1.2~3.8 mg/100g，故巴氏杀菌乳可用作乳铁蛋白的空白样本，考察乳粉样本的检出限和定量限，具体测定结果见表10。

表10. 乳粉样本中乳铁蛋白的检出限和定量限

测定次数	吸光值	根据标曲计算浓度 (ng/mL)	稀释 400 倍 (ug/mL)	平均值 (ug/mL)	标准偏差	检出限 (ug/mL)	定量限 (ug/mL)
1	0.288	6.580	2.63	2.633	0.052	2.790	3.154
2	0.284	6.438	2.58				
3	0.284	6.443	2.58				
4	0.282	6.387	2.55				
5	0.293	6.738	2.70				
6	0.288	6.570	2.63				
7	0.291	6.678	2.67				
8	0.291	6.675	2.67				
9	0.288	6.562	2.62				
10	0.294	6.761	2.70				

按照全脂奶粉和水的比例大约是1:6兑成纯牛奶，则乳粉中乳铁蛋白的检出限和定量限分别为1.95 mg/100g和2.21 mg/100g。

### (3) 精密度

选取三个奶粉样品进行测试，其中乳铁蛋白含量分别为60、90、100mg/100g。

#### A. 批内精密度

同一次测试中，每个样品平行测试10次，计算平均值、标准偏差以及变异系数，见表11。

表11. 乳铁蛋白试剂盒的批内精密度

样本名称	LF 含量 (mg/100g)	1	2	3	4	5	平均值 (mg/100g)	标准偏差 (mg/100g)	变异系数 (%)
澳优爱优 3 段	60	62.35	62.60	51.67	56.84	52.62	58.24	6.68	11.47
		68.43	58.86	67.02	49.90	52.08			
高培迪唯恩 3 段	90	79.95	95.25	102.90	88.78	90.04	90.96	9.46	10.40
		82.27	84.78	102.24	103.44	79.93			
美庐优能 3 段	100	100.10	110.26	87.62	86.40	103.40	101.42	8.80	8.67
		98.83	110.96	104.06	111.00	101.60			

#### B. 批间精密度

分三次测试，每次测定 3 个平行，计算平均值、标准偏差以及变异系数，具体见表 12。

样本名称	LF 含量 (mg/100g)	1	2	3	平均值 ( mg/100g )	标准偏差 ( mg/100g )	变异 系数 (%)
澳优爱优 3 段	60	63.70	54.23	50.25	55.92	7.09	12.68
		65.83	48.91	63.11			
		48.66	59.30	49.32			
高培迪唯恩 3 段	90	84.89	73.59	97.62	82.93	9.83	11.85
		94.75	73.79	73.14			
		79.95	92.53	76.14			
美庐优能 3 段	100	87.98	101.86	113.31	102.28	8.28	8.09
		95.02	103.53	105.25			
		110.27	108.49	94.78			

表12. 乳铁蛋白试剂盒的批内精密度

(4) 正确度

选取三个奶粉样品进行测试，其中乳铁蛋白含量分别为 60、90、100 mg/100g，分别计算平均值以及回收率，具体见表 13。

表13. 乳铁蛋白试剂盒的正确度

样本名称	LF 含量 (mg/100g)	1	2	3	4	5	平均值 (mg/100g)	回收 率(%)
澳优爱优 3 段	60	62.35	62.60	51.67	56.84	52.62	58.24	97.06
		68.43	58.86	67.02	49.90	52.08		
高培迪唯恩 3 段	90	79.95	95.25	102.90	88.78	90.04	90.96	101.06
		82.27	84.78	102.24	103.44	79.93		
美庐优能 3 段	100	100.10	110.26	87.62	86.40	103.40	101.42	101.42
		98.83	110.96	104.06	111.00	101.60		

(5) 特异性

分别配制浓度为 1000 ng/mL 的  $\alpha$ -乳白蛋白、 $\beta$ -乳球蛋白、 $\alpha$ -乳清蛋白、酪蛋白的浓度为，代入标准曲线（图 3），根据标曲计算得到相应的浓度，计算其交叉反应率（表 14）。

表14. 乳铁蛋白试剂盒的交叉反应

蛋白种类	CR
$\alpha$ -乳白蛋白	<0.5%
$\beta$ -乳球蛋白	<0.5%
$\alpha$ -乳清蛋白	<0.5%
酪蛋白	<0.5%

## 七 验证试验

本文件经 5 家单位，分别对卡那霉素 ELISA 试剂盒和乳铁蛋白的 ELISA 试剂盒的按标准文本进行了试验，实验结果证实该标准适用于酶联免疫试剂盒的检测。详细见附件。

#### **八 与有关的现行法律、法规和强制性标准的关系**

本标准与现行法律、法规和强制性标准没有冲突。

#### **九 标准在编写过程中意见分歧情况**

本标准在编写过程中没有重大意见分歧。

#### **十 标准宣贯建议及其他说明**

本标准为酶联免疫试剂盒检测的通用标准，且多用于快速筛选检测，并不涉及有关国家安全、保护人体健康和人身财产安全、环境质量要求等有关强制性地方标准或强制性条文等八项要求之一，因此建议将其作为推荐性标准颁布实施。

#### **主要参考文献**

- 1、GB/T 1.1-2020 《标准化工作导则 第1部分：标准的结构和编写规则》
- 2、GB/T33411-2016 《酶联免疫分析试剂盒通则》
- 3、GB/T40369-2021 《免疫层析试纸条检测通则》
- 4、GB/T 40265-2021 《酶免疫检测抗体检测通则》
- 5、GBT20001.4-2015 《标准规则编写-试验方法标准》
- 6、GB/T 27417-2017 《合格评定 化学分析方法确认和验证指南》
- 7、农业部的兽药残留酶联免疫试剂（盒）备案参考评判标准
- 8、GB/T 27404-2008 实验室质量控制规范食品理化检测
- 9、WS/T 124-1999 《临床化学体外诊断试剂盒质量检验总则》
- 10、食药监办械函[2013]3号 《酶联免疫法检测试剂注册技术审查指导原则》
- 11、SN/T 2775-2011 《商品化食品检测试剂盒评价方法》
- 12、YY/T1183-2010 《酶联免疫吸附法检测试剂》

# 附件1 25羟基维生素D检测试剂盒（酶联免疫法）说明书

- 5) 漩涡振荡混合器;
- 6) 自动洗板机 (可选项);
- 7) 酶标仪和数据分析软件。

## 2. 试剂准备

1) 质控品: 质控品以冻干品形式提供。将其复溶在 1ml 蒸馏水或去离子水中。盖好瓶盖室温下放置 10~15 分钟, 倒转几次确保充分溶解。保存于 2-8℃。

2) 25D 生物素: 冻干品形式提供, 加 3 mL 缓冲液至 25D 生物素的小瓶 (蓝色), 盖紧瓶盖室温下放置 10-15 分钟, 倒转几次确保充分溶解。将 3ml 复溶的 25D 生物素溶液倒回到装有缓冲液的小瓶内。盖紧瓶盖, 使 25D 生物素溶液与瓶内剩余的缓冲液充分混合, 此时的 25D 生物素溶液 (50 ml) 为绿色。标记该瓶子为“25D 生物素溶液”, 保存于 2-8℃。

3) 浓缩洗液: 将浓缩洗液加入至 950ml 的去离子水或蒸馏水中, 充分混合, 室温保存。

其他试剂直接使用。

所有试剂使用前恢复至室温, 反复倒转使其混合均匀。

## 3. 操作步骤

试剂复溶或准备见“试剂准备”。

1) 取已标记的玻璃或聚丙烯试管, 标准品、质控品和样本各准备一个。

2) 标准品、质控品和样本各取25μl分别加入到相应标记好的试管中。

3) 再加入25D生物素溶液1ml至所有试管中。用漩涡振荡混合器混合10秒。

4) 加入已稀释的标准品、质控品或样本各200μl于相应的酶标板微孔内。

贴上封板膜, 于18-25℃下温育2小时。

5) 用稀释好的洗液洗板3次

a. 自动洗板: 设置洗板机分配每孔至少300μl洗液。重复洗3次。

b. 手动洗板: 迅速颠倒倒出孔内物。每孔加入250μl冲洗液。再重复洗板2次。

在进入下一步前, 于吸水纸上用力拍打倒置的板以去除多余的洗液。

6) 采用多道移液器加入酶结合物200μl至所有微孔内。贴上封板膜, 于18-25℃下温育30分钟。

7) 重复步骤5)。

8) 每孔加入底物200μl。

贴上封板膜, 于18-25℃下温育30分钟。

注: 底物溶液易受到污染。仅移取检测所需要的量, 丢弃没用完的TMB底物, 请勿再倒回瓶内。

9) 每孔加入终止液100μl。

10) 加入终止液后的30分钟内在450nm (参考650nm) 波长处读取吸光度。

## 【参考值】

每个实验室应建立当地人群的参考值范围。

25 羟基维生素 D 浓度尚未有普遍认同的最佳浓度值。参考值应基于临床上对所有年龄各种性别确定的值, 而不只是基于人群的参考值范围。因此, 应开展大型的研究来调查血清中全段甲状旁腺激素与维生素 D 水平的关联。全段甲状旁腺激素盘的值在 ~30g/mL<sup>3</sup>。同样地, 钙吸收增强时, 25-OH D 水平也升高, 直至达到 ~30g/mL<sup>4</sup>。

有许多因素会影响 25 羟基维生素 D 值, 如饮食、当天的时间、太阳照射、季节<sup>5</sup>、地理位置<sup>6</sup>、年龄<sup>7</sup>、遮阳工具的使用及或防护服的穿戴<sup>8、9</sup>和皮肤色素沉着<sup>10</sup>。因此, 显著健康个体组采样并不是建立参考值范围的理想途径。

美国国家骨质疏松基金会推荐水平 >30ng/mL 可保护骨健康<sup>11</sup>。同时, 美国国家肾病基金会认为水平 <30ng/m 为缺乏或不足<sup>12</sup>。根据当前的文献回顾, 25 羟基维生素 D 水平推荐为:

水平	范围	
	nmol/L	ng/mL
缺乏	<25	<10
不足	25-74	10-29
充足	75-250	30-100
潜在中毒	>250	>100

以下范围是应用 IDS 25 羟基维生素 D 检测试剂盒 (酶联免疫法) 检测得到的, 仅供参考。

每个实验室应建立当地人群的参考值范围。

正常健康成人: 47.7-144 nmol/L (n=36)

## 【检验结果的解释】

计算标准品、质控品或者样本的百分结合率 (B/B<sub>0</sub>%)

$$B/B_0\% = \frac{\text{吸光度均值}}{\text{标准品0吸光度均值}} \times 100$$

绘制标准曲线: 以B/B<sub>0</sub>%为纵坐标, 25-OH-VD浓度为横坐标, 在半对数坐标纸上做出一条标准曲线。每个待测样本都计算B/B<sub>0</sub>%, 在标准曲线上找对应的25-OH-VD浓度值(nM)。

可采用选择性数据压缩技术, 但是应确认该选择的曲线是合适的且提供满意的结果。

推荐光滑曲线或4PL曲线。

单位间的转化:

$$X \text{ nmol/L} \times 0.40 = Y \text{ ng/mL} \text{ 或 } Y \text{ ng/mL} \times 2.5 = X \text{ nmol/mL}$$

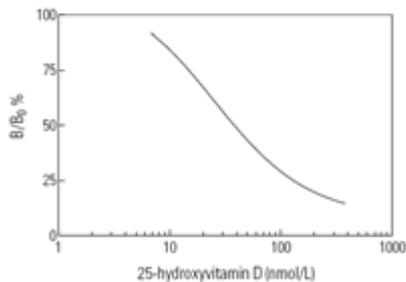
## 样本分析数据

分析数据只作例证用, 不能作为任何样本结果的计算。

孔号	项目	吸光率	平均值	B/B <sub>0</sub> %	结果 nmol/L
A1A2	标准品 0 0nmol/L	2.476 2.530	2.503		
B1B2	标准品 1 6.8nmol/L	2.313 2.288	2.301	91.9	
C1C2	标准品 2 14nmol/L	1.912 1.908	1.910	76.3	
D1D2	标准品 3 27nmol/L	1.495 1.499	1.497	59.8	
E1E2	标准品 4 67nmol/L	0.919 0.905	0.912	36.4	
F1F2	标准品 5 179nmol/L	0.521 0.522	0.522	20.8	
G1G2	标准品 6 380nmol/L	0.372 0.368	0.370	14.8	
H1H2	样本 1	1.237 1.257	1.247	49.8	39
A3A4	样本 2	0.951 0.969	0.960	38.4	62
B3B4	样本 3	0.591 0.612	0.602	24.0	138

典型标准曲线

该曲线只作例证，不作为任何样本结果的计算。



#### 【检验方法的局限性】

1. 若样本的浓度超过最高标准品的浓度，使用前应对样本进行稀释。
2. 诊断结果应结合患者的临床症状和临床医生所知的其他信息进行解析。
3. 在儿科人群中，本测定的性能指标未能建立。
4. 抗生物素蛋白引发的特高滴度抗体可能会产生一些干扰，这种情况非常罕见。  
经实验证实，下列物质在此浓度以下时不会对本测

试有干扰：

血红蛋白 检测高达 1470 mg/dL 时  
胆红素 检测高达 513 μmol/L 时  
血脂 检测高达 5.6 mmol/L 时

#### 【产品性能指标】

##### 1. 精确度

以IDS的25羟基维生素D检测试剂盒（酶联免疫法）与公认的定量检测25羟基维生素D和其他羟化产物的放射性免疫测定进行对比。选择代表较大25羟基维生素D范围 [9.3-151.2nmol/L]的180个样本通过每种方法检测。基于比较数据的基础上进行最小二乘回归分析：

$$IDS=1.01(X)+0.7; \text{ 相关系数}(r)=0.91$$

##### 2. 灵敏度

灵敏度（定义为 0 标准品 10 次重复测定的吸光度均值减去 2 个标准差对应的浓度）为 5 nmol/L。

##### 3. 精密度

批内分析 n=10		批间分析 n=10	
均值 (nmol/L)	%CV	均值 (nmol/L)	%CV
39.0	5.3	40.3	4.6
67.1	5.6	72.0	6.4
165	6.7	132	8.7

##### 4. 回收率

在测定前，通过在样本中加入 25-OH D 来评估回收率。

样本	测得值 nmol/L	期望值 nmol/L	回收率 %
A	122	126	97
A	95.6	98.4	97
B	147	141	104
B	123	118	105
		均值	101

##### 5. 线性

分析前用缓冲液（PBS包含9%的BSA）稀释样本以评估线性。

样本	测得值 (nmol/L)	预期值 (nmol/L)	%M/EXP
----	-----------------	-----------------	--------

A	83.9		
A/2	41.0	42.0	98
A/4	20.8	21.0	99
A/8	13.1	10.5	125
B	83.9		
B/2	43.5	42.0	104
B/4	23.1	21.0	110
B/8	10.7	10.5	102
C	104		
C/2	45.9	52.0	88
C/4	22.5	26.0	87
C/8	14.1	13.0	108
		平均值	102

#### 6. 特异性

在标准品050%的结合率时，用以下分析物评估抗血清的特异性。

分析物	交叉反应
25羟基维生素 D3	100%
25羟基维生素 D2	75%
24,25 双羟基维生素 D3	>100%
维生素D3 (D3)	<0.01%
钙化醇 (D2)	<0.30%

#### 【注意事项】

1. 本试剂盒仅供人和动物体外诊断，不得内用，必须严格按照说明书进行操作。由于不按说明书操作引起的损失和伤害（除了法令特别要求的），IDS 公司不承担任何由此引发的责任。

2. 本试剂盒包含人和/或动物来源的材料。盒中试剂应作为有潜在传染源来处理。储藏、操作和处理试剂应有适当的预防措施和良好的实验室操作。试剂的处理应当符合当地法令。

3. 人血清：本产品所用到的标准品和质控品在制备过程中使用到的人源性材料经过 HIV I & II & HBV & HCV 检测(FDA 推荐)呈阴性。因为没有任何测试能完全保证传染源的不存在，所有试剂应该按照生物安全 2 级水平处理；

4. 试剂盒中的某些试剂以叠氮化钠作为防腐剂，可与铅、铜或黄铜反应形成高爆炸性的金属叠氮化合物，处理时应用大量的水进行冲洗，避免形成叠氮化合物。

5. 终止液包含 0.5M 氯化氢溶液。

R36/38 对眼睛和皮肤有刺激。

S26 如不慎与眼接触，立刻以大量的水清洗，并寻求医师帮助。

S36/37 穿戴适当的防护服和手套。

6. 四甲基联苯胺

TMB 底物包含 3,3',5,5'-四甲基联苯胺

S21/22 皮肤接触或吞咽都是有害的，

S36/37 穿戴适当的防护服和手套。

#### 7. 试剂可能变坏的迹象

任何一个试剂中有反常微粒子出现。

标准品 0 吸光率下降。

曲线范围偏离正常位置。

#### 【参考文献】

1. Reichel, H., Koeffler, H.P., Norman, A.W. The role of the vitamin D endocrine system in health and disease. N. Engl. J. Med. 320: 981-991. (1989)
2. Holick, M.F., Vitamin D: Photobiology, Metabolism, etc., In "Primer on the Metabolic Bone Diseases and Disorders of Mineral Metabolism", American Society for Bone and Mineral Research., 3rd Ed. Lippincott-Raven, Philadelphia, 74-81. (1996).
3. Chapuy M-C, Preziosi P, Maamer M, et al. Prevalence of vitamin D insufficiency in an adult normal population. Osteoporos Int 1997;7: 439-443.
4. Heaney, RP. Functional indices of vitamin D status and ramifications of vitamin D deficiency. Am J Clin Nutr 2004;80 (suppl):1706S-1709S.
5. Holick MF. Sunlight and vitamin D for bone health and prevention of autoimmune diseases, cancers, and cardiovascular disease. Am J Clin Nutr 2004; 80: 1678S - 1688S.
6. Webb AR, Kline L, Holick MF. Influence of season and latitude on the cutaneous synthesis of vitamin D3: exposure to winter sunlight in Boston and Edmonton will not promote vitamin D3 synthesis in human skin. J Clin Endocrinol Metab 1988;67: 373-378.
7. Holick MF, Matsuoka LY, Wortsman J. Age, vitamin D and solar ultraviolet. Lancet 1989;ii:1104-1105.
8. Matsuoka LY, Iide L, Wortsman J et al. Sunscreens suppress cutaneous vitamin D3 synthesis. J Clin Endocrinol Metab 1987;64:1165-1168.
9. Salih FM. Effect of clothing varieties on solar photosynthesis of previtamin D3: an in vitro study. Photodermatol Photoimmunol Photomed 2004;20: 53-58.
10. Clemens TL, Henderson SL, Adams JS, Holick MF. Increased skin pigment reduces the capacity of skin to synthesize vitamin D3. Lancet 1982;9:74-76.
11. National Osteoporosis Foundation. Prevention -Vitamin D. <http://www.nof.org/prevention/vitaminD.htm>
12. KDOQI Clinical Practice Guidelines for Bone Metabolism and Disease in Children With Chronic Kidney Disease. [http://www.kidney.org/PROFESSIONALS/kdoqi/guidelines\\_pedbone/guide8.htm](http://www.kidney.org/PROFESSIONALS/kdoqi/guidelines_pedbone/guide8.htm) Doc: AC-57PL-A  
Issue: 8  
2009年8月4日

#### 【生产企业及售后服务单位】

生产者名称：英国 Immunodiagnostic Systems Limited(IDS Ltd)

生产者/生产场所地址：10 Didcot Way, Boldon Business Park, Boldon, Tyne & Wear, NE35 9PD, UK

电话：+44 (0) 191 519 0660

传真：+44 (0) 191 519 0760

网址：www.idsltd.com

售后服务机构：北京荣志海达生物科技有限公司

地址：北京市海淀区永定路 88 号长银大厦 12 层 B12 室

电话：010-58895646 020-32293178

传真：010-58895611 020-32293177

电子邮箱：info@rz-biotech.com

网址：www.rz-biotech.com

#### 【医疗器械注册证书编号】

国食药监械（进）字 2011 号第 2403360 号

【产品标准编号】YZB/UK 4271-2011

【说明书批准及修改日期】2011 年 10 月 25 日

## 附件2 人TNF- $\alpha$ ELISA试剂盒说明书

### ab181421 Human TNF alpha SimpleStep ELISA® Kit

For the quantitative measurement of TNF alpha in human serum, plasma, and cell culture supernatant.  
For research use only - not intended for diagnostic use.

For overview, typical data and additional information please visit: [www.abcam.com/ab181421](http://www.abcam.com/ab181421)

**Storage and Stability:** Store kit at +4°C immediately upon receipt. Refer to list of materials supplied for storage conditions of individual components. Observe the storage conditions for individual prepared components in the Materials Supplied section.

#### Materials Supplied

Item	Quantity	Storage Condition
Human TNF alpha Capture Antibody 10X	600 $\mu$ L	+4°C
Human TNF alpha Detector Antibody 10X	600 $\mu$ L	+4°C
Human TNF alpha Lyophilized Recombinant Protein	2 Vials	+4°C
Antibody Diluent 4BR	6 mL	+4°C
10X Wash Buffer PT	20 mL	+4°C
TMB Development Solution	12 mL	+4°C
Stop Solution	12 mL	+4°C
Sample Diluent NS	50 mL	+4°C
SimpleStep Pre-Coated 96-Well Microplate	96 Wells	+4°C
Plate Seal	1	+4°C

#### Materials Required, Not Supplied

These materials are not included in the kit, but will be required to successfully utilize this assay:  
Microplate reader capable of measuring absorbance at 450 or 600 nm.  
Method for determining protein concentration (BCA assay recommended).  
Deionized water.  
PBS [1.4 mM KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>, 8 mM Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub>, 140 mM NaCl, 2.7 mM KCl, pH 7.4].  
Multi- and single-channel pipettes.  
Tubes for standard dilution.  
Plate shaker for all incubation steps.  
Optional: Phenylmethylsulfonyl Fluoride (PMSF) (or other protease inhibitors).

#### Reagent Preparation

Equilibrate all reagents to room temperature (18-25°C) prior to use. The kit contains enough reagents for 96 wells. **The sample volumes below are sufficient for 48 wells (6 x 8-well strips); adjust volumes as needed for the number of strips in your experiment.** Prepare only as much reagent as is needed on the day of the experiment. Capture and Detector Antibodies have only been tested for stability in the provided 10X formulations.

#### Sample Preparation

TYPICAL SAMPLE DYNAMIC RANGE	
Sample Type	Range
Serum*	$\leq$ 1:40
Plasma – Citrate*	$\leq$ 1:40
Plasma – EDTA*	$\leq$ 1:40
Plasma – Herapin*	$\leq$ 1:40
PBMC cell culture supernatant**	1:80 -1:10

\*Based on spiked sample  
\*\*Range can vary depending on stimulation factors

**Plasma** Collect plasma using citrate, EDTA or heparin. Centrifuge samples at 2,000 x g for 10 minutes. Dilute samples at least 1:40 into Sample Diluent NS and assay. Store undiluted plasma samples at -20°C or below for up to 3 months. Avoid repeated freeze thaw cycles.

**Serum** Samples should be collected into a serum separator tube. After clot formation, centrifuge samples at 2,000 x g for 10 minutes and collect serum. Dilute samples at least 1:40 into Sample Diluent NS and assay. Store un-diluted serum at -20°C or below. Avoid repeated freeze-thaw cycles.

**Cell Culture Supernatants** Centrifuge cell culture media at 2,000 x g for 10 minutes to remove debris. Collect supernatants and assay. Or dilute samples at least 1:10 into Sample Diluent NS and assay. Store un-diluted samples at -20°C or below. Avoid repeated freeze thaw cycles.

#### Plate Preparation

- The 96 well plate strips included with this kit are supplied ready to use. It is not necessary to rinse the plate prior to adding reagents.
- Unused plate strips should be immediately returned to the foil pouch containing the desiccant pack, resealed and stored at 4°C.
- For each assay performed, a minimum of two wells must be used as the zero control. For statistical reasons, we recommend each sample should be assayed with a minimum of two replicates (duplicates).
- Differences in well absorbance or "edge effects" have not been observed with this assay.

#### Assay Procedure

Equilibrate all materials and prepared reagents to room temperature prior to use. We recommend that you assay all standards, controls and samples in duplicate.

- Prepare all reagents, working standards, and samples as directed in the previous sections.

**1X Wash Buffer PT:** Prepare 1X Wash Buffer PT by diluting 10X Wash Buffer PT with deionized water. To make 50 mL 1X Wash Buffer PT combine 5 mL 10X Wash Buffer PT with 45 mL deionized water. Mix thoroughly and gently.

**Antibody Cocktail:** Prepare Antibody Cocktail by diluting the capture and detector antibodies in Antibody Diluent 4BR. To make 3 mL of the Antibody Cocktail combine 300  $\mu$ L 10X Capture Antibody and 300  $\mu$ L 10X Detector Antibody with 2.4 mL Antibody Diluent 4BR. Mix thoroughly and gently.

#### Standard Preparation

Prepare serially diluted standards immediately prior to use. Always prepare a fresh set of positive controls for every use. The following section describes the preparation of a standard curve for duplicate measurements (recommended).

- IMPORTANT:** If the protein standard vial has a volume identified on the label, reconstitute the TNF alpha standard by adding that volume of Sample Diluent NS indicated on the label. Alternatively, if the vial has a mass identified, reconstitute the TNF alpha standard by adding 1000  $\mu$ L Sample Diluent NS. Hold at room temperature for 10 minutes and mix gently. This is the 10000 pg/mL Stock Standard Solution.
- Label eight tubes, Standards 1–8.
- Add 360  $\mu$ L Sample Diluent NS into tube number 1 and 150  $\mu$ L of Sample Diluent NS into numbers 2–8.
- Use the Stock Standard to prepare the following dilution series. Standard #8 contains no protein and is the Blank control:

Standard #	Dilution Sample	Volume to Dilute ( $\mu$ L)	Volume of Diluent ( $\mu$ L)	Starting Conc. (pg/mL)	Final Conc. (pg/mL)
1	Stock	40	360	10,000	1,000
2	Standard#1	150	150	1,000	500
3	Standard#2	150	150	500	250
4	Standard#3	150	150	250	125
5	Standard#4	150	150	125	62.5
6	Standard#5	150	150	62.5	31.25
7	Standard#6	150	150	31.25	15.63
8	Blank Control	0	300	0	0

To convert sample values obtained with the kit to approximate NIBSC 12/154 units, use the following equation: NIBSC (12/154) approximate value (IU/mL) = 0.094 x SimpleStep Human TNF alpha value (pg/mL).

- Remove excess microplate strips from the plate frame, return them to the foil pouch containing the desiccant pack, resealed and return to 4°C storage.
- Add 50  $\mu$ L of all sample or standard to appropriate wells.
- Add 50  $\mu$ L of the Antibody Cocktail to each well.
- Seal the plate and incubate for 1 hour at room temperature on a plate shaker set to 400 rpm.
- Wash each well with 3 x 350  $\mu$ L 1X Wash Buffer PT. Wash by aspirating or decanting from wells then dispensing 350  $\mu$ L 1X Wash Buffer PT into each well. Complete removal of liquid at each step is essential for good performance. After the last wash invert the plate and blot it against clean paper towels to remove excess liquid.
- Add 100  $\mu$ L of TMB Development Solution to each well and incubate for 10 minutes in the dark on a plate shaker set to 400 rpm. Given variability in laboratory environmental conditions, optimal incubation time may vary between 5 and 20 minutes. Note: The addition of Stop Solution will change the color from blue to yellow and enhance the signal intensity about 3X. To avoid signal saturation, proceed to the next step before the high concentration of the standard reaches a blue color of O.D.600 equal to 1.0.
- Add 100  $\mu$ L of Stop Solution to each well. Shake plate on a plate shaker for 1 minute to mix. Record the OD at 450 nm. This is an endpoint reading.
- Alternative to 7–8: Instead of the endpoint reading at 450 nm, record the development of TMB Substrate kinetically. Immediately after addition of TMB Development Solution begin recording the blue color development with elapsed time in the microplate reader prepared with the following settings:

Mode	Kinetic
Wavelength	600 nm
Time	up to 20 min
Interval	20 sec - 1 min
Shake	Shake between readings

**Note** that an endpoint reading can also be recorded at the completion of the kinetic read by adding 100  $\mu$ L Stop Solution to each well and recording the OD at 450 nm.

#### Download our ELISA guide for technical hints, results, calculation, and troubleshooting tips:

[www.abcam.com/protocols/the-complete-elisa-guide](http://www.abcam.com/protocols/the-complete-elisa-guide)

For technical support contact information, visit: [www.abcam.com/contactus](http://www.abcam.com/contactus)

Copyright © 2021 Abcam. All Rights Reserved. All information / detail is correct at time of going to print.  
Version 4 | 2021-11-08

## ab181421 Human TNF alpha SimpleStep ELISA® Kit

### ASSAY SPECIFICITY

This kit is designed for the quantification of Human TNF alpha.

Native signal we detected in cell culture supernatant

Spiked protein experiments were used to validate serum, plasma citrate, plasma EDTA, plasma heparin and cerebrospinal fluid

### CROSS REACTIVITY –

Recombinant proteins were prepared at 1000 pg/mL and assayed for cross reactivity. No cross reactivity was found for the following targets: - Human IL-2 - Human IL-4 - Human IL-1 alpha - Human IFN gamma - Human TNF beta - Human TNF R1.

### INTERFERENCE –

Recombinant Human TNF R1 was prepared at 1000 pg/mL and tested for interference. No interference with was observed.

### SPECIES REACTIVITY -

This kit recognizes human TNF alpha protein.

Other species reactivity was determined by measuring 1000 pg/mL recombinant proteins of various species, interpolating the protein concentrations from the human standard curve, and expressing the interpolated concentrations as a percentage of the protein concentration assayed at the same dilution. Reactive species: Primate

Reactivity < 3% was determined for the following species: Mouse/Rat

### CALIBRATION

This immunoassay is calibrated against a highly purified human TNF alpha. The NIBSC/WHO unclassified purified human TNF alpha preparation 12/154 was evaluated in this kit. The dose response curve of the unclassified standard TNF alpha parallels the SimpleStep standard curve. To convert sample values obtained with the SimpleStep Human TNF alpha kit to approximate NIBSC 12/154 International units, use the equation below.

NIBSC (12/154) approximate value (IU/mL) = 0.094 x SimpleStep Human TNF alpha value (pg/mL).

### CALCULATION –

- Calculate the average absorbance value for the blank control (zero) standards. Subtract the average blank control standard absorbance value from all other absorbance values.
  - Create a standard curve by plotting the average blank control subtracted absorbance value for each standard concentration (y-axis) against the target protein concentration (x-axis) of the standard. Use graphing software to draw the best smooth curve through these points to construct the standard curve.
- Δ Note: Most microplate reader software or graphing software will plot these values and fit a curve to the data. A four parameter curve fit (4PL) is often the best choice; however, other algorithms (e.g. linear, semi-log, log/log, 4 parameter logistic) can also be tested to determine if it provides a better curve fit to the standard values.
- Determine the concentration of the target protein in the sample by interpolating the blank control subtracted absorbance values against the standard curve. Multiply the

resulting value by the appropriate sample dilution factor, if used, to obtain the concentration of target protein in the sample.

- Samples generating absorbance values greater than that of the highest standard should be further diluted and reanalyzed. Similarly, samples which measure at an absorbance values less than that of the lowest standard should be retested in a less dilute form.

### TYPICAL DATA

Typical standard curve – data provided for demonstration purposes only. A new standard curve must be generated for each assay performed

Concentration (pg/mL)	Standard Curve Measurement		Mean O.D
	1	2	
0	0.061	0.068	0.065
15.63	0.127	0.123	0.125
31.25	0.189	0.206	0.197
62.5	0.312	0.312	0.312
125	0.555	0.521	0.538
250	1.065	1.030	1.048
500	1.925	1.941	1.933
1000	3.362	3.161	3.262

Figure 1. Example of human TNF alpha standard curve in Sample Diluent NS. The TNF alpha standard curve was prepared as described in Section 10. Raw data values are shown in the table. Background-subtracted data values (mean +/- SD) are graphed.

### TYPICAL SAMPLE VALUES

#### Sensitivity:

The calculated minimal detectable dose (MDD) is 4.32 pg/mL. The MDD was determined by calculating the mean of zero standard replicates (n=24) and adding 2 standard deviations then extrapolating the corresponding concentration.

### Recovery

Three concentrations of TNF alpha recombinant protein were spiked in duplicate to the indicated biological matrix to evaluate signal recovery in the working range of the assay.

Sample Type	Average Recovery	% Range (%)
2.5% Serum	88	83-93
2.5% Plasma-Citrate	91	86-97
2.5% Plasma-EDTA	100	95-104
2.5% Plasma-Heparin	98	89-110
5% PHA-M treated PBMC Cell Culture supernatant*	110	105-113
50% Cerebrospinal Fluid	83	80 - 88

\*Media is RPMI 1640 containing 10% fetal calf serum.

### Linearity of Dilution

Linearity of dilution is determined based on interpolated values from the standard curve. Linearity of dilution defines a sample concentration interval in which interpolated target concentrations are directly proportional to sample dilution.

Native TNF alpha was measured in the following biological samples in a 2-fold dilution series. Sample dilutions are made in Sample Diluent NS.

Dilution Factor	Interpolated value	10% PHA-M Treated PBMC Cell Culture Supernatant
Undiluted	pg/mL	726.56
	% Expected value	100
2	pg/mL	355.55
	% Expected value	98
4	pg/mL	183.66
	% Expected value	101
8	pg/mL	94.78
	% Expected value	104

Recombinant TNF alpha was spiked into the following biological samples and diluted in a 2-fold dilution series in Sample Diluent NS.

Dilution Factor	Interpolated value	2.5% Human Serum	2.5% Human Plasma (Citrate)	2.5% Human Plasma (EDTA)	2.5% Human Plasma (Heparin)	50% Human Cerebro-spinal Fluid
Undiluted	pg/mL	447.20	451.09	483.71	499.11	392.65
	% Expected value	100	100	100	100	100
2	pg/mL	223.35	234.34	244.59	237.17	192.55
	% Expected value	100	104	101	95	98
4	pg/mL	119.50	127.27	123.94	120.73	110.67
	% Expected value	107	113	102	97	113
8	pg/mL	60.23	59.54	62.05	60.11	56.51
	% Expected value	108	106	103	96	115
16	pg/mL	28.78	NL	NL	NL	NL
	% Expected value	103	NL	NL	NL	NL

Twenty individual healthy human female/male donors were measured in duplicate for the presence of TNF alpha. All values were below the detectable range of the assay NL – Non-Linear

### Precision

Mean coefficient of variations of interpolated values of TNF alpha from a single concentration of PHA-M treated PBMC cell culture supernatant within the working range of the assay.

	Intra-assay	Inter-assay
N=	8	3
CV (%)	2.5	3.1

Download our ELISA guide for technical hints, results, calculation, and troubleshooting tips:

[www.abccom.com/protocols/the-complete-elisa-guide](http://www.abccom.com/protocols/the-complete-elisa-guide)

For technical support contact information, visit: [www.abccom.com/contactus](http://www.abccom.com/contactus)

Copyright © 2021 Abcam. All Rights Reserved. All information / detail is correct at time of going to print. Version 4a | 2021-11-08

## 附件3 卡那霉素ELISA试剂盒说明书

### ab287806 – Kanamycin ELISA Kit

For the quantitative measurement of Kanamycin in Tissue, Milk and milk powder.  
For research use only - not intended for diagnostic use.

For overview, typical data and additional information please visit:  
<http://www.abcam.com/ab287806>

#### Storage and Stability

The entire kit may be stored at 4°C for up to 12 months from the date of shipment. Opened kit may be stable for 1 month at 4°C.

#### Materials Supplied

Item	Quantity	Storage Condition
Micro ELISA Plate	8 x 12 Strips	4°C
Standard (S0-S5)	1 mL x 6	4°C
HRP-Conjugate	7 mL	4°C
Antibody	7 mL	4°C
TMB Substrate	12 mL	4°C
Stop Solution	10 mL	4°C
Sample Diluent	20 mL	4°C
10X Wash Buffer	30 mL	4°C
Plate sealers	4 units	4°C

#### Materials Required, Not Supplied

These materials are not included in the kit, but will be required to successfully utilize this assay:

- Chemicals: Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub>·12H<sub>2</sub>O, NaH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>·2H<sub>2</sub>O, and Trichloroacetic acid (TCA)
- Microplate reader capable of measuring absorbance at 450 nm
- 25°C incubator
- Precision pipettes with disposable tips
- Distilled or deionized water
- Clean eppendorf tubes and graduated cylinders for preparing standards or sample dilutions
- Absorbent paper

#### Reagent Preparation

- Bring all reagents to room temperature (20-25°C) 30 minutes before use
- Before using the kit, spin tubes and bring down all components to the bottom of tubes.

**Extraction Solution 1:** Weigh 5.37 g of Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub>·12H<sub>2</sub>O and 0.78 g of NaH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>·2H<sub>2</sub>O to 100 ml of deionized water, mix thoroughly.

**Extraction Solution 2:** Dilute 5 ml of Sample Diluent into 95 ml deionized or distilled water, mix well.

**Extraction Solution 3:** Dilute 3 g of TCA into 100 ml deionized or distilled water, shake well

- or autowasher, and let it stand for 30 seconds, complete removal of liquid at each step is essential to good performance.
4. Add 100 µl of TMB Substrate to each well, mix well, incubate for 15 minutes at 25°C. Protect from light.
  5. Add 50 µl of Stop Solution to each well, gently tap the plate to ensure thorough mixing.
  6. Read result at 450 nm within 10 minutes

#### Calculations

The mean values of the absorbance values obtained for the standards and the samples are divided by the absorbance value of the first standard (zero standard) and multiplied by 100%. The zero standard is thus made equal to 100% and the absorbance values are quoted in percentages.

$$\text{Absorbance Value (\%)} = B/B0 \times 100\%$$

B: The average absorbance value of the sample or standard  
B<sub>0</sub>: The average absorbance value of the 0 ppb standard

To draw a standard curve: Take the absorbency value of standards as y-axis, logarithmic of the concentration of the Kanamycin standards solution (ppb) as x-axis. The Kanamycin concentration of each sample (ppb), which can be read from the calibration curve, is multiplied by the corresponding dilution factor of each sample, allowing for the actual concentration of sample to be obtained.

Download our ELISA guide for technical hints, results, calculation, and troubleshooting tips:  
[www.abcam.com/protocols/the-complete-elisa-guide](http://www.abcam.com/protocols/the-complete-elisa-guide)

For technical support contact information, visit: [www.abcam.com/contactus](http://www.abcam.com/contactus)

Copyright © 2021 Abcam. All Rights Reserved. All information / detail is correct at time of going to print. Version 1 | 2021-September-14

**Wash Buffer (1X):** If crystals have formed in the concentrate, warm up to room temperature and mix gently until the crystals have completely dissolved. Dilute 10 mL of 10X Wash Buffer into 90 mL deionized or distilled water to prepare 100 ml of 1X Wash Buffer. Keep it at 4°C for one month.

#### Standard Preparation

Standards	S0	S1	S2	S3	S4	S5
Concentration (ppb)	0	0.5	1.5	4.5	13.5	40.5

#### Sample Preparation

- The prepared sample maybe stored for up to one day at 2-8°C

#### Milk and Fresh Milk:

1. Bring the milk sample to room temperature.
2. Transfer 100 µL of sample into a new centrifugal tube and add 900 µL of Extraction Solution 1, shake well.
3. Take 50 µL of sample for further analysis.  
**Δ Note:** Dilution factor: 10

#### Milk Powder:

1. Weigh 1 g of milk powder sample, add 5ml of Extraction Solution 2, shake properly for 5 min.
2. Add 4 ml of Extraction Solution 3, shake properly for 5 min. Centrifuge at 4000 rpm for 10 min.
3. Transfer 100 µL of supernatant into a new centrifugal tube, add 200 µL of Sample Diluent, shake well.
4. Take 50 µL of sample for further analysis.  
**Δ Note:** Dilution factor: 30

#### Tissue (chicken, pork):

1. Weigh 1 g of the homogenized tissue sample, add 10 ml of Extraction Solution 1, shake properly for 5 min. Centrifuge at 4000 rpm for 10 min.
2. Take 50 µL of supernatant sample for further analysis  
**Δ Note:** Dilution factor: 10

#### Assay Procedure

- Bring all reagents and samples to room temperature 30 minutes prior to the assay.
- It is recommended that all standards and samples be run at least in duplicate.
- A standard curve should be run for each assay.

1. Prepare all reagents, samples, and standards.
2. Add 50 µL of Standard or Sample per well. Then add 50 µL of HRP-conjugate to each well and 50 µL of Antibody to each well. Cover the microtiter plate with a new adhesive strip and mix well, then incubate for 30 min at 25°C.
3. Aspirate each well and wash, repeating the process 4 times. Wash by filling each well with 250 µL of Wash Buffer using a squirt bottle, multi-channel pipette, manifold dispenser,

## 附件4 牛乳铁蛋白ELISA试剂盒说明书

Version 2a Last updated 10 May 2021

# ab274406 – Bovine Lactoferrin ELISA Kit

For the determination of Lactoferrin in bovine biological samples.

View ab274406

Bovine Lactoferrin ELISA Kit datasheet:

[www.abcam.com/ab274406](http://www.abcam.com/ab274406)

(use [www.abcam.cn/ab274406](http://www.abcam.cn/ab274406) for China, or [www.abcam.co.jp/ab274406](http://www.abcam.co.jp/ab274406) for Japan)

This product is for research use only and is not intended for diagnostic use.

Copyright © 2021 Abcam. All rights reserved

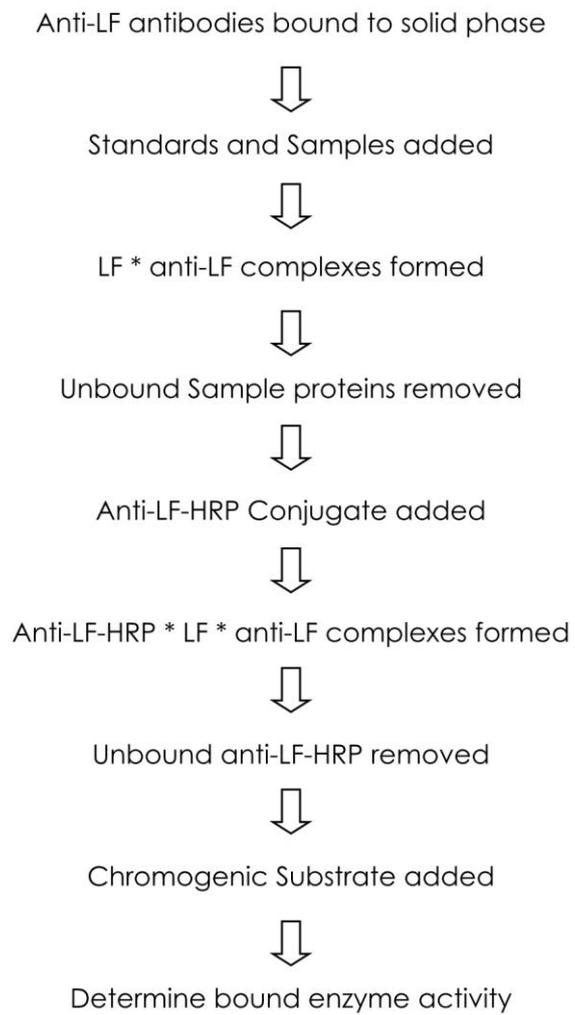
## Table of Contents

1. Overview	1
2. Protocol Summary	2
3. Precautions	3
4. Storage and Stability	3
5. Limitations	4
6. Materials Supplied	4
7. Materials Required, Not Supplied	5
8. Technical Hints	6
9. Reagent Preparation	7
10. Sample Collection and Storage	8
11. Sample Preparation	9
12. Standard Curve preparation	10
13. Assay Procedure	11
14. Calculations	12
15. Notes	13
<b>Technical Support</b>	<b>14</b>

## 1. Overview

The Bovine Lactoferrin ELISA kit (ab274406) is a highly sensitive two-site enzyme linked immunoassay (ELISA) for measuring Lactoferrin (LF) in bovine biological samples.

## 2. Protocol Summary



### **3. Precautions**

**Please read these instructions carefully prior to beginning the assay.**

All kit components have been formulated and quality control tested to function successfully as a kit. Modifications to the kit components or procedures may result in loss of performance.

### **4. Storage and Stability**

- Store the kit at +4 to +8°C in the dark immediately upon receipt.
- Kit has a storage time of 1 year from receipt, providing components have not been reconstituted.
- Refer to list of materials supplied for storage conditions of individual components. Observe the storage conditions for individual prepared components in the Reagent Preparation section.

## 5. Limitations

- This assay will perform as described only when the assay procedure is carefully followed and with adherence to good laboratory practice.
- Factors that might affect the performance of the assay include proper instrument function, cleanliness of glassware, quality of distilled or deionized water, accuracy of reagent and sample pipetting, washing technique, incubation time and/or temperature.
- Do not mix or substitute reagents with those from other lots or sources.

## 6. Materials Supplied

Item	Quantity	Storage Condition
Antibody coated plate	96 wells	4°C
Bovine Lactoferrin Calibrator (Lyophilized)	1 vial	4°C
5X Diluent Buffer concentrate	50 mL	4°C
20X Wash Buffer Concentrate	50 mL	4°C
100X HRP Conjugated Bovine Lactoferrin antibody	1 vial	4°C (Store in dark)
Chromogen Substrate Solution	12 mL	4°C (Store in dark)
Stop Solution	12 mL	4°C

## 7. Materials Required, Not Supplied

These materials are not included in the kit, but will be required to successfully perform this assay:

- Microplate reader capable of measuring absorbance at 450 nm.
- Microplate washer/ aspirator
- Precision pipettes to deliver 2  $\mu$ L to 200  $\mu$ L volumes.
- Adjustable 1-25 mL pipettes for reagent preparation.
- Timer
- Distilled or deionized water.
- Log-log graph paper or computer and software for ELISA data analysis.
- Tubes to prepare standard or sample dilutions.
- Assorted glassware for the preparation of reagents and buffer solutions.

## 8. Technical Hints

- Samples which generate values that are greater than the most concentrated standard should be further diluted in the appropriate sample dilution buffer.
- Avoid foaming or bubbles when mixing or reconstituting components.
- Avoid cross contamination of samples or reagents by changing tips between sample, standard and reagent additions.
- Ensure plates are properly sealed or covered during incubation steps.
- Completely aspirate all solutions and buffers during wash steps. When preparing your standards, it is critical to briefly spin down the vial first. The powder may adhere to the cape and not be included in the standard solution resulting in an incorrect concentration. Be sure to dissolve the powder thoroughly when reconstituting. After adding Assay Diluent to the vial, we recommend inverting the tube a few times, then flick the tube a few times, and then spin it down; repeat this procedure 3-4 times. This is an effective technique for thorough mixing of the standard without using excessive mechanical force.
- Do not vortex the standard during reconstitution, as this will destabilize the protein.
- Once your standard has been reconstituted, it should be used right away or else frozen for later use.
- Keep the standard dilutions on ice during preparation, but the ELISA procedure should be done at room temperature.
- Be sure to discard the working standard dilutions after use – they do not store well.
- This kit is sold based on number of tests. A 'test' simply refers to a single assay well. The number of wells that contain sample, control or standard will vary by product. Review the protocol completely to confirm this kit meets your requirements. Please contact our Scientific Support staff with any questions.

## 9. Reagent Preparation

- Equilibrate all reagents to room temperature (18-25°C) prior to use. The kit contains enough reagents for 96 wells.

### 9.1 1X Diluent Solution

The diluent solution is supplied as 5X Diluent Concentrate and must be diluted 1/5 with distilled or deionized water (1 part buffer concentrate, 4 parts dH<sub>2</sub>O). The 1X Diluent Solution is stable for at least one week from the date of preparation and should be stored at +4-8°C.

### 9.2 1X Wash Buffer

The wash solution is supplied as 20X Concentrate and must be diluted 1/20 with distilled or deionized water (1 part buffer concentrate, 19 parts dH<sub>2</sub>O). Crystal formation in the concentrate is not uncommon when storage temperatures are low. Warming of the concentrate to 30 - 35°C before dilution can dissolve crystals. The 1X Wash Buffer is stable for at least one week from the date of preparation and can be stored at +4-8°C.

### 9.3 1X HRP-Conjugated Bovine lactoferrin antibody

Calculate the required amount of 1X Enzyme-Antibody Conjugate solution for each microtitre plate test strip by adding 10 µL Enzyme-Antibody Conjugate to 990 µL of 1X Diluent for each test strip to be used for testing (1/100 dilution). Dilute immediately before use and protect from light. Mix uniformly, but gently. Avoid foaming.

### 9.4 Antibody coated plate

Ready to use as supplied. Unseal foil pouch and remove plate from pouch. Remove all strips and wells that will not be used in the assay and place back in pouch and re-seal along with desiccant.

### 9.5 Calibrator (Lyophilized)

Prepare according to Section 12.

### 9.6 Chromogen Substrate and Stop Solution:

Ready to use as supplied.

## 10. Sample Collection and Storage

- All blood components and biological materials should be handled as potentially hazardous. Follow universal precautions when handling and disposing.
- If blood samples are clotted, grossly hemolyzed, lipemic, or the integrity of the sample is of concern, make a note and interpret results with caution.
- The sample collection and storage conditions listed below are intended as general guidelines. Sample stability has not been evaluated.
- Known interfering substances - Azide and thimerosal at concentrations higher than 0.1% inhibits the enzyme reaction.

### 10.1 Serum:

Blood should be collected by venipuncture. The serum should be separated from the cells after clot formation by centrifugation. Remove serum and assay immediately or aliquot and store samples at  $-80^{\circ}\text{C}$  (preferably) or  $-20^{\circ}\text{C}$ . Avoid repeated freeze-thaw cycles.

### 10.2 Plasma:

Blood should be collected into a container with an anticoagulant and then centrifuged. Assay immediately or aliquot and store samples at  $-80^{\circ}\text{C}$  (preferably) or  $-20^{\circ}\text{C}$ . Avoid repeated freeze-thaw cycles.

### 10.3 Urine

Collect mid-stream using sterile or clean urine collector. Centrifuge to remove cell debris. Assay immediately or aliquot and store samples at  $-80^{\circ}\text{C}$  (preferably) or  $-20^{\circ}\text{C}$ . Avoid repeated freeze-thaw cycles.

## 11. Sample Preparation

### General Sample information:

The assay requires that each test sample be diluted before use. All samples should be assayed in duplicate each time the assay is performed. The recommended dilutions are only suggestions. Dilutions should be based on the expected concentration of the unknown sample such that the diluted sample falls within the dynamic range of the standard curve. If unsure of sample level, a serial dilution with one or two representative samples before running the entire plate is highly recommended.

#### 11.1 Serum

Recommended starting dilution is 1/4. To prepare a 1/4 dilution of a sample, transfer 150  $\mu$ L of sample to 450  $\mu$ L of 1X diluent. This gives you a 1/4 dilution. Mix thoroughly.

#### 11.2 Plasma

Recommended starting dilution is 1/4. To prepare a 1/4 dilution of a sample, transfer 150  $\mu$ L of sample to 450  $\mu$ L of 1X diluent.

#### 11.3 Milk samples

Recommended starting dilution is 1/400. To prepare a 1/400 dilution of a sample, transfer 5  $\mu$ L of sample to 495  $\mu$ L of 1X diluent to achieve a 1/100 dilution. Next, dilute the 1/100 by transferring 150  $\mu$ L into 450  $\mu$ L of 1X diluent to achieve a 1/400 dilution.

## 12. Standard Curve preparation

- A standard curve should be generated each time the test is performed.

12.1 Add 1.0 ml of distilled or de-ionized water to the Calibrator and mix gently until dissolved to obtain the concentration shown on the label (the reconstituted Calibrator should be aliquoted and frozen if future use is intended) The standards need to be prepared immediately prior to use (see table below).

12.2 Mix well between each step and avoid foaming.

Note: The table below is an **example** of when the calibrator concentration is 1.520 µg/ml. Actual concentration of the standards should be calculated according to the concentration described on the vial.

Standard	Volume added to 1X Diluent (µl)	Volume of 1X Diluent	Std conc. ng/ml
6	100 µl of 1.52 µg/ml Calibrator	660 µl	200
5	300 µl std #6	300 µl	100
4	300 µl std #5	300 µl	50
3	300 µl std #4	300 µl	25
2	300 µl std #3	300 µl	12.5
1	300 µl std #2	300 µl	6.25
0	---	600 µl	0

### 13. Assay Procedure

- We recommend that you assay all standards, controls and samples in duplicate.

13.1 The Standards and the test sample(s) should be loaded into the ELISA wells as quickly as possible to avoid a shift in OD readings. Using a multichannel pipette would reduce this occurrence.

Pipette 100  $\mu$ L of the below standards in duplicate:

Standard	Concentration (ng/mL)
0	0.0
1	6.25
2	12.5
3	25
4	50
5	100
6	200

- 13.2 Pipette 100  $\mu$ L of sample (in duplicate) into pre designated wells.
- 13.3 Incubate the microtiter plate at room temperature for thirty ( $30 \pm 2$ ) minutes. Keep plate covered and level during incubation.
- 13.4 Following incubation, aspirate the contents of the wells.
- 13.5 Completely fill each well with appropriately diluted Wash Solution and aspirate. Repeat three times, for a total of four washes. If washing manually: completely fill wells with wash buffer, invert the plate then pour/shake out the contents in a waste container. Follow this by sharply striking the wells on absorbent paper to remove residual buffer. Repeat 3 times for a total of four washes.
- 13.6 Pipette 100  $\mu$ L of appropriately diluted Enzyme-Antibody Conjugate to each well. Incubate at room temperature for thirty ( $30 \pm 2$ ) minutes. Keep plate covered in the dark and level during incubation.
- 13.7 Wash and blot the wells as described in 13.4 - 13.5.
- 13.8 Pipette 100  $\mu$ L of Chromogen Substrate Solution into each well.

- 13.9 Incubate in the dark at room temperature for precisely ten (10) minutes.
- 13.10 After ten minutes, add 100  $\mu$ L of Stop Solution to each well.
- 13.11 Determine the absorbance (450 nm) of the contents of each well within 30 minutes. Calibrate the plate reader to manufacturer's specifications.

## 14. Calculations

- 14.1 Subtract the average background value (Average absorbance reading of Standard zero) from the test values for each sample.
- 14.2 Average the duplicate readings for each standard and use the results to construct a Standard Curve. Construct the standard curve by reducing the data using computer software capable of generating a four parameter logistic curve fit. A second order polynomial (quadratic) or other curve fits may also be used; however, they will be a less precise fit of the data.
- 14.3 Interpolate test sample values from standard curve. Correct for sera dilution factor to arrive at the LF concentration in original samples.

## 附件5 乳粉中氨基糖苷类抗生素的LC-MS/MS鉴定结果

仪器分析方法原始记录 (GC/LC/MS)

共 页

动植物与食品检测中心食品实验室

### 仪器分析方法原始记录 (GC/LC/MS)

项目名称	氨基糖苷类		样品名称	奶粉					
检验依据	SOP-SP-019		检测起止日期	2022.09.10-2022.09.13					
辅助设备编号	电子天平编号: <u>116</u> 检定有效期至 <u>2023.01.03</u>			<input type="checkbox"/> 复检					
样品编号	称样量 M(g)	稀释倍数	定容体积 V(mL)	结果					
				待测浓度 C (ng/mL)	待测含 (μg/kg)	报告结果(μg/kg)			
			1			2	4		
NF-1	2.03	/	1.0	/	/	<50	<50	<50	
NF-1	2.01	/	1.0	/	/	<50	<50	<50	
质控	<input checked="" type="checkbox"/> 加标基质 <input type="checkbox"/> 空白基质 <input type="checkbox"/> 质控图 <input type="checkbox"/> 质控样								
	样品编号	NF		标准溶液编号/浓度 (μg/mL)	NXP-C-220612AM I-01		1000		
	标准溶液有效期至				2022.12.12				
	加标体积 (μL)	外标	200	移液枪编号		QV-50μL-03			
	质控图/质控样编号			质控值 (μg/kg)	质控范围				
	检测项目	本底值 (μg/kg)	加标量 (μg/kg)	测定值(μg/kg)	回收率(%)	备注			
	卡那霉素	0	100	98.5	98.5				
庆大霉素	0	100	109.4	109.4					
新霉素	0	100	99.4	99.4					
标准曲线	<input type="checkbox"/> 试剂配制 <input type="checkbox"/> 空白基质处理液配制 <input type="checkbox"/> 在线稀释 <input checked="" type="checkbox"/> 空白基质加标曲线								
	标准中间液编号/浓度 (μg/mL)	标准溶液有效期至	稀释浓度 (ng/mL)						
			1	2	3	4	5		
NXP-Z-220612AMI-01/10.0 μg/mL	2022.12.12	10	20	50	100	200			

FL-010-01-2018

<p>检测方法</p>	<p>SOP-SP-019</p>	<p>前处理： 称取样品，加入缓冲溶液提取，涡旋 5min，超声 15min，离心，取液过 HLB 小柱净化，N2 吹干后 0.02mol/L 醋酸铵定容，LC-MS/MS 检测 仪器条件： 仪器名称及编号：TSQ Quantiva (319) 检定有效期：2023.09.08 色谱柱：Proteomix WCX-NP5 5um,4.6*100mm 柱温：20℃ 流动相/载气：甲醇：30mmol/L 醋酸铵溶液：0.5%甲酸；甲醇 进样量：20ul 流速：0.35ml/min 其他参数： ESI 电离源正离子检测电喷雾接口温度 350℃ 鞘气流速：35 辅助气流速：6</p>	
<p>检测项目： 1. 卡那霉素(kanamycin) (V-A03) 2. 庆大霉素(gentamycin)(V-A04) 3. 潮霉素 B (Hygromycin-B) (V-A11) 4. 新霉素(neomycin) (V-A06)</p>			
<p>计算公式： <math>X = C * \frac{V * 1000}{m * 1000}</math></p> <p>X — 试样中被测组分残留量，单位为微克每千克 (µg/kg)； C — 从标准曲线得到的被测组分溶液浓度，单位为纳克每毫升 (ng/mL)； V — 试样溶液定容体积，单位为毫升 (mL)； m — 试样溶液所代表的质量，单位为克 (g)。</p>			
<p>备注：附色谱图及校正曲线</p>			
<p>检验人</p>	<p>宁晓盼</p>	<p>复核人</p>	<p>殷耀</p>

FL-010-01-2018

Quantify Sample Report

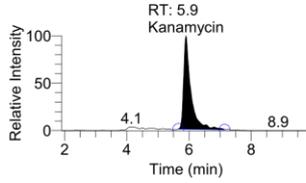
Printed: Tuesday, September 13, 2022, 09:27:33 Page 4 of 9

Current Workbook Path: D:\lcquan\aminoglycoside\2022\20220913-JN-genneo-KANA

Date: 10-Sep-2022, Instrument: TSQ Quantiva, Vial: RA4, Name: D:\data\2022\AMINOGLYCOSIDE\09\0910\NF-STD4, Comments: , ID: 1

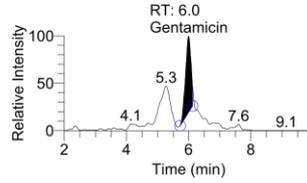
Kanamycin

NF-STD4 - m/z= 163.15-163.15 RT: 1.90 - 9.90  
F: + c ESI SRM ms2 485.300 [102.179-102.181 ...



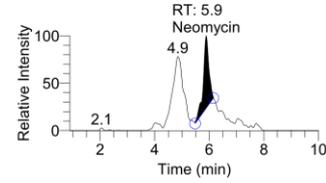
Gentamicin

NF-STD4 - m/z= 322.20-322.20 RT: 1.99 - 9.99  
F: + c ESI SRM ms2 478.325 [112.208-112.210 ...



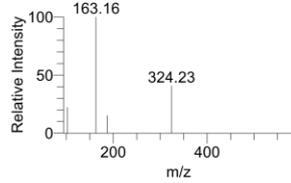
Neomycin

NF-STD4 - m/z= 163.15-163.15 RT: 0.89 - 10.01  
F: + c ESI SRM ms2 615.325 [161.175-161.177 ...

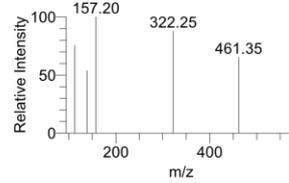


Date: 10-Sep-2022, Instrument: TSQ Quantiva, Vial: RA4, Name: D:\data\2022\AMINOGLYCOSIDE\09\0910\NF-STD4, Comments: , ID: 1

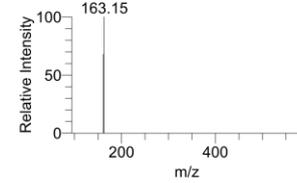
#2475 RT: 5.90 NL: 5.60E3  
F: + c ESI SRM ms2 485.300 [102.179-102.181 ...



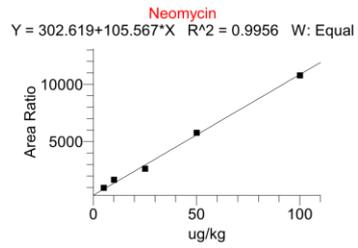
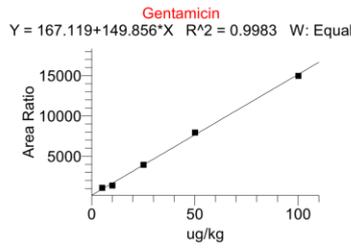
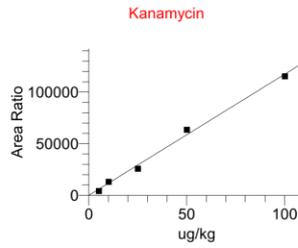
#2516 RT: 5.99 NL: 1.08E3  
F: + c ESI SRM ms2 478.325 [112.208-112.210 ...



#2471 RT: 5.89 NL: 6.12E2  
F: + c ESI SRM ms2 615.325 [161.175-161.177 ...



Date: 10-Sep-2022, Instrument: TSQ Quantiva, Vial: RA4, Name: D:\data\2022\AMINOGLYCOSIDE\09\0910\NF-STD4, Comments: , ID: 1



File Name	Component Name	Calculated Conc	Units	Area	RT	Calibration Equation	Calibration Curve r^2
NF-STD4	Kanamycin	54.314	ug/kg	63696	5.90	Y = -27.5919+1173.23*X	0.9955
NF-STD4	Gentamicin	52.126	ug/kg	7978	5.99	Y = 167.119+149.856*X	0.9983
NF-STD4	Neomycin	51.951	ug/kg	5787	5.89	Y = 302.619+105.567*X	0.9956

There is no signature data to report.

**Quantify Sample Report**

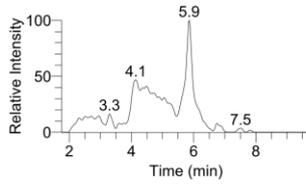
Printed: Tuesday, September 13, 2022, 09:27:33 Page 6 of 9

Current Workbook Path: D:\lcquan\aminoglycoside\2022\202200913-JN-genneo-KANA

**Date: 10-Sep-2022, Instrument: TSQ Quantiva, Vial: RA6, Name: D:\data\2022\AMINOGLYCOSIDE\09\0910\BLANK, Comments: , ID: 1**

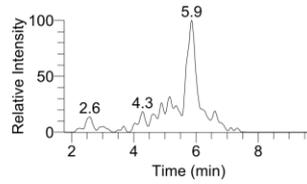
**Kanamycin**

BLANK - m/z= 163.15-163.15 RT: 1.75 - 9.75  
F: + c ESI SRM ms2 485.300 [102.179-102.181 ...



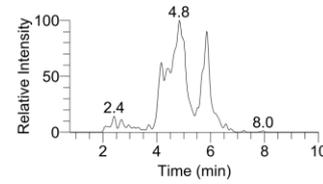
**Gentamicin**

BLANK - m/z= 322.20-322.20 RT: 1.76 - 9.76  
F: + c ESI SRM ms2 478.325 [112.208-112.210 ...



**Neomycin**

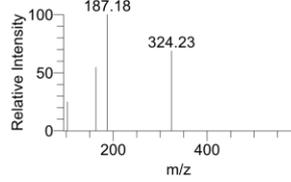
BLANK - m/z= 163.15-163.15 RT: 0.77 - 10.01  
F: + c ESI SRM ms2 615.325 [161.175-161.177 ...



**Date: 10-Sep-2022, Instrument: TSQ Quantiva, Vial: RA6, Name: D:\data\2022\AMINOGLYCOSIDE\09\0910\BLANK, Comments: , ID: 1**

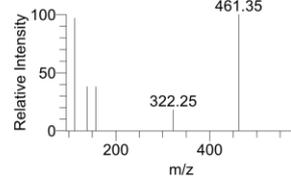
#2412 RT: 5.75 NL: 4.04E2

F: + c ESI SRM ms2 485.300 [102.179-102.181 ...



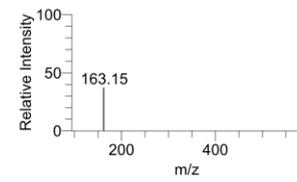
#2418 RT: 5.76 NL: 1.57E3

F: + c ESI SRM ms2 478.325 [112.208-112.210 ...



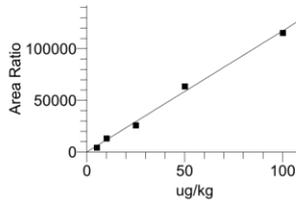
#2422 RT: 5.77 NL: 5.28E2

F: + c ESI SRM ms2 615.325 [161.175-161.177 ...



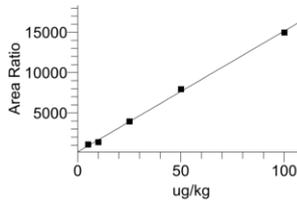
**Date: 10-Sep-2022, Instrument: TSQ Quantiva, Vial: RA6, Name: D:\data\2022\AMINOGLYCOSIDE\09\0910\BLANK, Comments: , ID: 1**

**Kanamycin**



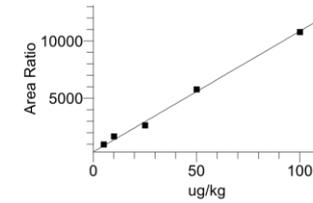
**Gentamicin**

$Y = 167.119 + 149.856 * X$   $R^2 = 0.9983$  W: Equal



**Neomycin**

$Y = 302.619 + 105.567 * X$   $R^2 = 0.9956$  W: Equal



File Name	Component Name	Calculated Conc	Units	Area	RT	Calibration Equation	Calibration Curve r <sup>2</sup>
BLANK	Kanamycin	NC	ug/kg	N/A	N/A	$Y = -27.5919 + 1173.23 * X$	0.9955
BLANK	Gentamicin	NC	ug/kg	N/A	N/A	$Y = 167.119 + 149.856 * X$	0.9983
BLANK	Neomycin	NC	ug/kg	N/A	N/A	$Y = 302.619 + 105.567 * X$	0.9956

There is no signature data to report.

Quantify Sample Report

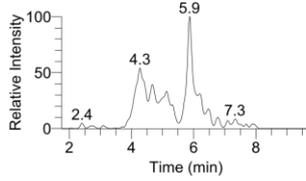
Printed: Tuesday, September 13, 2022, 09:27:33 Page 7 of 9

Current Workbook Path: D:\lcquan\aminoglycoside\2022\20220913-JN-genneo-KANA

Date: 10-Sep-2022, Instrument: TSQ Quantiva, Vial: RA7, Name: D:\data\2022\AMINOGLYCOSIDE\09\0910\JN-BENDI, Comments: , ID: 1

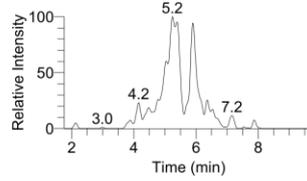
Kanamycin

JN-BENDI - m/z= 163.15-163.15 RT: 1.75 - 9.75  
F: + c ESI SRM ms2 485.300 [102.179-102.181 ...



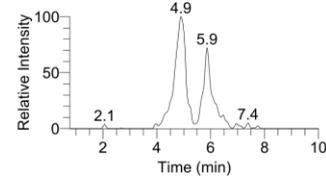
Gentamicin

JN-BENDI - m/z= 322.20-322.20 RT: 1.76 - 9.76  
F: + c ESI SRM ms2 478.325 [112.208-112.210 ...



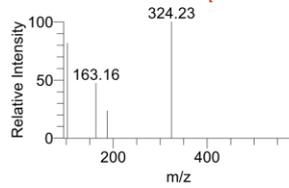
Neomycin

JN-BENDI - m/z= 163.15-163.15 RT: 0.77 - 10.01  
F: + c ESI SRM ms2 615.325 [161.175-161.177 ...

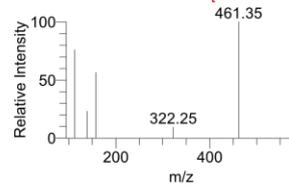


Date: 10-Sep-2022, Instrument: TSQ Quantiva, Vial: RA7, Name: D:\data\2022\AMINOGLYCOSIDE\09\0910\JN-BENDI, Comments: , ID: 1

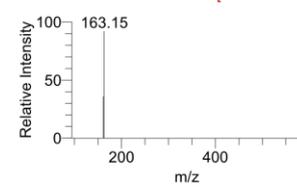
#2412 RT: 5.75 NL: 1.49E2  
F: + c ESI SRM ms2 485.300 [102.179-102.181 ...



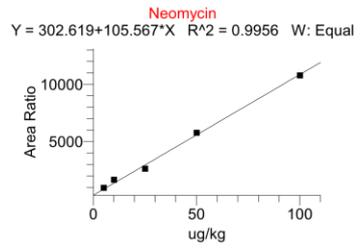
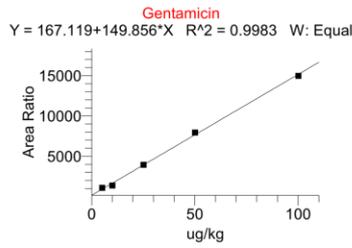
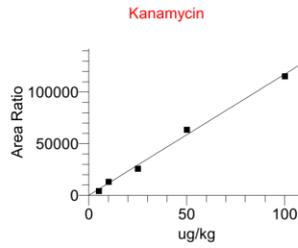
#2418 RT: 5.76 NL: 5.80E2  
F: + c ESI SRM ms2 478.325 [112.208-112.210 ...



#2422 RT: 5.77 NL: 1.79E2  
F: + c ESI SRM ms2 615.325 [161.175-161.177 ...



Date: 10-Sep-2022, Instrument: TSQ Quantiva, Vial: RA7, Name: D:\data\2022\AMINOGLYCOSIDE\09\0910\JN-BENDI, Comments: , ID: 1



File Name	Component Name	Calculated Conc	Units	Area	RT	Calibration Equation	Calibration Curve r^2
JN-BENDI	Kanamycin	NC	ug/kg	N/A	N/A	Y = -27.5919+1173.23*X	0.9955
JN-BENDI	Gentamicin	NC	ug/kg	N/A	N/A	Y = 167.119+149.856*X	0.9983
JN-BENDI	Neomycin	NC	ug/kg	N/A	N/A	Y = 302.619+105.567*X	0.9956

There is no signature data to report.

Quantify Sample Report

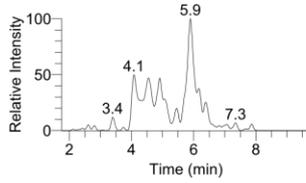
Printed: Tuesday, September 13, 2022, 09:27:34 Page 8 of 9

Current Workbook Path: D:\lcquan\aminoglycoside\2022\20220913-JN-genneo-KANA

Date: 10-Sep-2022, Instrument: TSQ Quantiva, Vial: RA7, Name: D:\data\2022\AMINOGLYCOSIDE\09\0910\JN-BEND2, Comments: , ID: 1

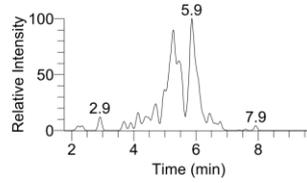
Kanamycin

JN-BEND2 - m/z= 163.15-163.15 RT: 1.75 - 9.75  
F: + c ESI SRM ms2 485.300 [102.179-102.181 ...



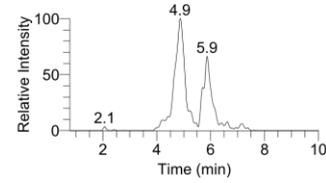
Gentamicin

JN-BEND2 - m/z= 322.20-322.20 RT: 1.76 - 9.76  
F: + c ESI SRM ms2 478.325 [112.208-112.210 ...



Neomycin

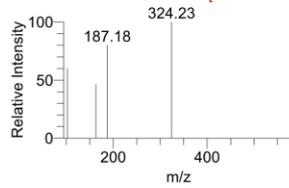
JN-BEND2 - m/z= 163.15-163.15 RT: 1.76 - 9.76  
F: + c ESI SRM ms2 615.325 [161.175-161.177 ...



Date: 10-Sep-2022, Instrument: TSQ Quantiva, Vial: RA7, Name: D:\data\2022\AMINOGLYCOSIDE\09\0910\JN-BEND2, Comments: , ID: 1

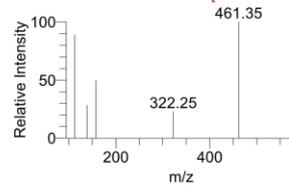
#2412 RT: 5.75 NL: 1.31E2

F: + c ESI SRM ms2 485.300 [102.179-102.181 ...



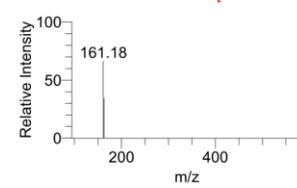
#2418 RT: 5.76 NL: 4.57E2

F: + c ESI SRM ms2 478.325 [112.208-112.210 ...



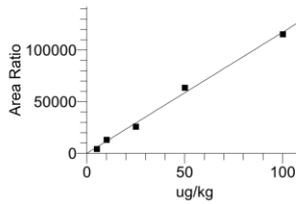
#2422 RT: 5.77 NL: 1.88E2

F: + c ESI SRM ms2 615.325 [161.175-161.177 ...



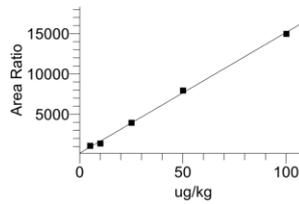
Date: 10-Sep-2022, Instrument: TSQ Quantiva, Vial: RA7, Name: D:\data\2022\AMINOGLYCOSIDE\09\0910\JN-BEND2, Comments: , ID: 1

Kanamycin



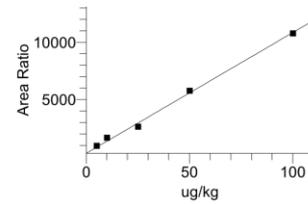
Gentamicin

$Y = 167.119 + 149.856 * X$   $R^2 = 0.9983$  W: Equal



Neomycin

$Y = 302.619 + 105.567 * X$   $R^2 = 0.9956$  W: Equal



File Name	Component Name	Calculated Conc	Units	Area	RT	Calibration Equation	Calibration Curve r^2
JN-BEND2	Kanamycin	NC	ug/kg	N/A	N/A	$Y = -27.5919 + 1173.23 * X$	0.9955
JN-BEND2	Gentamicin	NC	ug/kg	N/A	N/A	$Y = 167.119 + 149.856 * X$	0.9983
JN-BEND2	Neomycin	NC	ug/kg	N/A	N/A	$Y = 302.619 + 105.567 * X$	0.9956

There is no signature data to report.

Quantify Sample Report

Printed: Tuesday, September 13, 2022, 09:27:34 Page 9 of 9

Current Workbook Path: D:\lcquan\aminoglycoside\2022\20220913-JN-genneo-KANA

Date: 10-Sep-2022, Instrument: TSQ Quantiva, Vial: RA8, Name:  
 D:\data\2022\AMINOGLYCOSIDE\09\0910\SPIKE-JN100UL, Comments: , ID: 1

Kanamycin

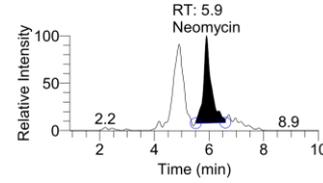
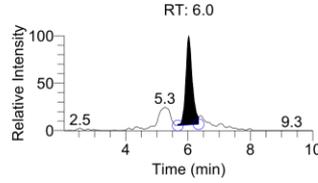
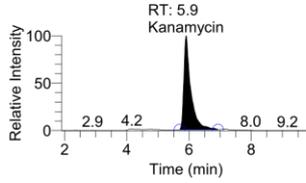
SPIKE-JN100UL - m/z= 163.15-163.15 RT:  
 F: + c ESI SRM ms2 485.300 [102.179-102.181 ...

Gentamicin

SPIKE-JN100UL - m/z= 322.20-322.20 RT:  
 F: + c ESI SRM ms2 478.325 [112.208-112.210 ...

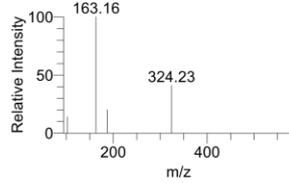
Neomycin

SPIKE-JN100UL - m/z= 163.15-163.15 RT:  
 F: + c ESI SRM ms2 615.325 [161.175-161.177 ...

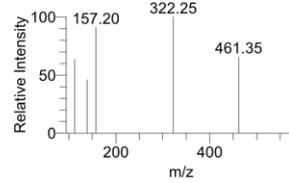


Date: 10-Sep-2022, Instrument: TSQ Quantiva, Vial: RA8, Name:  
 D:\data\2022\AMINOGLYCOSIDE\09\0910\SPIKE-JN100UL, Comments: , ID: 1

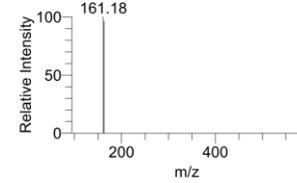
#2475 RT: 5.90 NL: 9.55E3  
 F: + c ESI SRM ms2 485.300 [102.179-102.181 ...



#2530 RT: 6.03 NL: 1.49E3  
 F: + c ESI SRM ms2 478.325 [112.208-112.210 ...

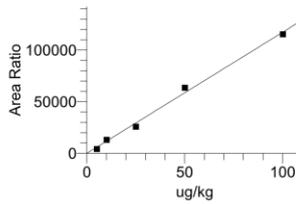


#2478 RT: 5.90 NL: 6.77E2  
 F: + c ESI SRM ms2 615.325 [161.175-161.177 ...



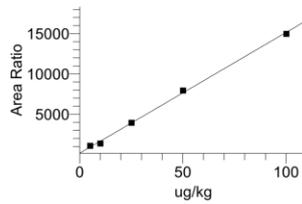
Date: 10-Sep-2022, Instrument: TSQ Quantiva, Vial: RA8, Name:  
 D:\data\2022\AMINOGLYCOSIDE\09\0910\SPIKE-JN100UL, Comments: , ID: 1

Kanamycin



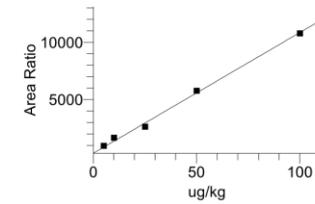
Gentamicin

$Y = 167.119 + 149.856 * X$   $R^2 = 0.9983$  W: Equal



Neomycin

$Y = 302.619 + 105.567 * X$   $R^2 = 0.9956$  W: Equal



File Name	Component Name	Calculated Conc	Units	Area	RT	Calibration Equation	Calibration Curve r^2
SPIKE-JN100UL	Kanamycin	98.491	ug/kg	115526	5.90	$Y = -27.5919 + 1173.23 * X$	0.9955
SPIKE-JN100UL	Gentamicin	109.390	ug/kg	16560	6.03	$Y = 167.119 + 149.856 * X$	0.9983
SPIKE-JN100UL	Neomycin	99.361	ug/kg	10792	5.90	$Y = 302.619 + 105.567 * X$	0.9956

There is no signature data to report.