

三聚氰胺检测试剂盒使用说明书

(酶联免疫法)

1 原理及用途

本试剂盒采用间接竞争 ELISA 方法检测奶粉、牛奶、组织、饲料、蛋类、血清等样本中的三聚氰胺 (Melamine, MEL)，试剂盒由预包被偶联抗原的酶标板、辣根酶标记物、抗体、标准品及其他配套试剂组成。检测时，加入标准品或样本溶液，样本中的三聚氰胺和酶标板上预包被偶联抗原竞争抗三聚氰胺抗体，加入酶标记物后，用 TMB 底物显色，样本吸光度值与其所含三聚氰胺含量成负相关，与标准曲线比较即可得出样本中三聚氰胺的残留量。

2 技术指标

2.1 试剂盒灵敏度: 2ppb(ng/ml)

2.2 反应模式: 25°C, 30min~15min

2.3 检测下限:

奶粉.....	40ppb
牛奶.....	54ppb
牛奶/奶粉 (处理法二)	2ppb
组织 (鸡/猪/鸭/鱼/虾/肝脏)	4ppb
饲料.....	200ppb
蛋类.....	40ppb
血清.....	8ppb

2.4 交叉反应率:

三聚氰胺.....	100%
三聚氰酸.....	60%
三嗪、三嗪二铵.....	<1%

2.5 样本回收率:

牛奶、奶粉.....	90%±20%
组织.....	85%±20%
饲料.....	85%±20%
蛋类.....	80%±20%

3 试剂盒组成

酶标板.....	96 孔
标准液: 各 1ml	
0ppb、2ppb、6ppb、18ppb、54ppb、162ppb	
高标准液 (红盖): 1ppm.....	1ml
酶标记物 (红盖)	5.5ml
抗体工作液 (蓝盖)	5.5ml
底物液 A (白盖)	6ml
底物液 B (黑盖)	6ml
终止液 (黄盖)	6ml
20X 浓缩洗涤液 (白盖)	40ml
2X 复溶液 (黄盖)	50ml

4 需要的器材和试剂

4.1 仪器：酶标仪、打印机、均质器、氮气吹干装置、振荡器、离心机、刻度移液管、天平（感量0.01g）

4.2 微量移液器：单道 20 μ l-200 μ l，100 μ l-1000 μ l、多道 300 μ l

4.3 试剂：乙腈、氢氧化钠、浓盐酸、正己烷、甲醇

5 样本前处理

5.1 样本处理前须知：

实验器具必须洁净并使用一次性吸头，以避免污染干扰实验结果。

5.2 配液：

配液 1：1M HCl 溶液

取 8.6ml 浓 HCl 加去离子水至 100ml。

配液 2：乙腈-0.1M NaOH 溶液

84ml 乙腈和 16ml 0.1M NaOH 混合均匀。

配液 3：0.1M NaOH 溶液

称取 0.4g NaOH 加去离子水至 100ml。

配液 4：1M NaOH 溶液

称取 4g NaOH 加去离子水至 100ml。

配液 5：复溶液

将 2 \times 复溶液用去离子水 2 倍稀释，用于样本的复溶，复溶液在 4 $^{\circ}$ C 环境可保存一个月。

5.3 样本前处理步骤：

5.3.1 牛奶专用样本处理方法：

- 1) 取牛奶样本 600 μ l 到 2ml 的离心管中，加入 1ml 乙腈，充分振荡混匀；4000r/min 离心 5min；
- 2) 取 100 μ l 上清液，加入 900 μ l 复溶液，混匀；
- 3) 取 50 μ l 用于分析。

牛奶样本稀释倍数：27 检测下限：54ppb

5.3.2 奶粉专用样本处理方法：

- 1) 称取 2.0 \pm 0.05g 奶粉样本至 50ml 离心管中，加入 4ml 甲醇，充分振荡；
- 2) 4000r/min 离心 10min，取 100 μ l 上清液，再加入 900 μ l 复溶液，混匀；
- 3) 取 50 μ l 用于分析。

奶粉样本稀释倍数：20 检测下限：40ppb

5.3.3 牛奶/奶粉样本处理方法二：

- 1) 取 2ml 奶样或 2g 奶粉至离心管中；
- 2) 加入 8ml 乙腈-0.1M NaOH 充分振荡 2min，4000r/min 离心 10min，取 4ml 上清液 50-60 $^{\circ}$ C 下氮气或空气流吹至完全干燥；
- 3) 用 1ml 正己烷溶解干燥的残留物后，再加入 1ml 复溶液，混合 30s，离心去除上层正己烷相；
- 4) 取下层水相 50 μ l 用于分析。

样本稀释倍数：1 检测下限：2ppb

5.3.4 组织（鸡/猪/鸭/鱼/虾/肝脏）样本处理方法：

- 1) 取 2.0 \pm 0.05g 均匀组织样本于 50ml 离心管中；
- 2) 加入 8ml 乙腈-0.1M NaOH 充分振荡 2min，4000r/min 离心 10min，取 2ml 上清液 50-60 $^{\circ}$ C 下氮气或空气流吹至完全干燥；
- 3) 用 1ml 正己烷溶解干燥的残留物后，再加入 1ml 复溶液，混合 30s，离心去除上层正己烷相；
- 4) 取下层水相 50 μ l 用于分析。

样本稀释倍数: 2 检测下限: 4ppb

5.3.5 饲料样本处理方法:

- 1) 将饲料样品研碎, 称 $2.0\pm 0.05\text{g}$ 研碎的饲料样品, 加入 2ml 1M HCl, 加入 16ml 去离子水均质;
- 2) 旋流 1min, 放振荡器上振荡 2min;
- 3) 4000r/min 离心 15min, 取出 10ml 上清液并用 1M NaOH 将 pH 值调至 6-8。(注: 因饲料样品的不同, 加入 1M NaOH 的量有所差异, 根据情况调节, 一般加入范围是 0.5ml—1ml 之间)
- 4) 4000r/min 离心 15min, 吸出上清液(如果上清仍然浑浊可提高转速或用滤纸过滤);
- 5) 取上清液用复溶液 10 倍稀释(取 100 μl 上清液加入 900 μl 复溶液, 混合均匀);
- 6) 取 50 μl 进行分析。

样本稀释倍数: 100 检测下限: 200ppb

5.3.6 蛋类样本处理方法:

- 1) 用均质器低速均匀样本(蛋清、蛋黄或全蛋);
- 2) 称取 $2.0\pm 0.05\text{g}$ 均质过的样本, 加入 8ml 乙腈-0.1M NaOH 充分振荡 2min;(蛋清含蛋白成份高, 加入提取液后会形成一团胶状物, 较蛋黄或全蛋难摇匀, 此情况为正常现象不影响实验结果)
- 3) 4000r/min 离心 10min, 取 1ml 上清液 50-60 $^{\circ}\text{C}$ 下氮气或空气流吹至完全干燥;
- 4) 用 1ml 正己烷溶解干燥的残留物后, 再加入 1ml 复溶液, 混合 30s, 离心去除上层正己烷相;
- 5) 取下层水相用复溶液 4 倍稀释(50 μl 样本液加 150 μl 复溶液), 混合 30s;
- 6) 取 50 μl 用于分析。

样本稀释倍数: 20 检测下限: 40ppb

5.3.7 血清样本处理方法:

- 1) 取 0.5ml 血清样本于 50ml 离心管中;
- 2) 加入 2ml 乙腈-0.1M NaOH 充分振荡 2min, 4000r/min 离心 10min, 取 1ml 上清液 50-60 $^{\circ}\text{C}$ 下氮气或空气流吹至完全干燥;
- 3) 用 1ml 正己烷溶解干燥的残留物后, 再加入 1ml 复溶液, 混合 30s, 离心去除上层正己烷相;
- 4) 取下层水相 50 μl 用于分析。

样本稀释倍数: 4 检测下限: 8ppb

6 酶联免疫试验步骤

将所需试剂从 4 $^{\circ}\text{C}$ 冷藏环境中取出, 置于室温平衡 30min 以上, 洗涤液冷藏时可能会有结晶需恢复到室温以充分溶解, 每种液体试剂使用前均须摇匀。取出需要数量的微孔板及框架, 将不用的微孔板放入自封袋, 保存于 2-8 $^{\circ}\text{C}$ 。

实验开始前, 用去离子水将 20 \times 浓缩洗涤液按 20 倍稀释成工作洗涤液。

6.1 编号: 将样本和标准品对应微孔按序编号, 每个样本和标准品做 2 孔平行, 并记录标准孔和样本孔所在的位置。

6.2 加样反应: 加标准品或样本 50 μl /孔到各自的微孔中, 然后加酶标记物 50 μl /孔, 再加入 50 μl /孔的抗体工作液, 用盖板膜封板, 轻轻振荡 5 秒混匀, 25 $^{\circ}\text{C}$ 反应 30 分钟。

6.3 洗涤: 小心揭开盖板膜, 将孔内液体甩干, 用工作洗涤液 250 μl /孔充分洗涤 5 次, 每次间隔 30 秒, 用吸水纸拍干(拍干后未被清除的气泡可用干净的枪头刺破)。

6.4 显色: 每孔加入底物液 A 50 μl , 再加底物液 B 50 μl , 轻轻振荡 5 秒混匀, 25 $^{\circ}\text{C}$ 避光显色 15 分钟。

6.5 终止: 每孔加入终止液 50 μl , 轻轻振荡混匀, 终止反应。

6.6 测吸光值: 用酶标仪于 450nm 处测定每孔吸光度值(建议用双波长 450/630nm)。测定应在终止反应后 10 分钟内完成。

7 结果分析

7.1 百分吸光率的计算

标准液或样本的百分吸光率等于标准液或样本的百分吸光度值的平均值（双孔）除以第一个标准液（Oppb）的吸光度值，再乘以 100%，即

$$\text{百分吸光度值 (\%)} = \frac{A}{A_0} \times 100\%$$

A—标准溶液或样本溶液的平均吸光度值

A0—Oppb 标准溶液的平均吸光度值

7.2 标准曲线的绘制与计算

以标准液百分吸光率为纵坐标，对应的标准液浓度（ppb）的对数为横坐标，绘制标准液的半对数曲线图。将样本的百分吸光率代入标准曲线中，从标准曲线上读出样本所对应的浓度，乘以其对应的稀释倍数即为样本中待测物的实际浓度。

若利用试剂盒专业分析软件进行计算，更便于大量样本的准确、快速分析。（欢迎来电索取）

8 注意事项

8.1 室温低于 25°C 或试剂及样本没有回到室温（25°C）会导致所有标准的 OD 值偏低。

8.2 在洗板过程中如果出现板孔干燥的情况，则会出现标准曲线不成线性，重复性不好的现象。所以洗板拍干后应立即进行下一步操作。

8.3 混合要均匀，洗板要彻底，在 ELISA 分析中的再现性，很大程度上取决于洗板的一致性。

8.4 在所有孵育过程中，用盖板膜封住微孔板，避免光线照射。

8.5 不要使用过了有效期的试剂盒，不要交换使用不同批号试剂盒中的试剂。

8.6 显色液若有任何颜色表明变质，应当弃之。0 标准的吸光度值小于 0.5 个单位（A450nm < 0.5）时，表示试剂可能变质。

8.7 反应终止液有腐蚀性，避免接触皮肤。

9 贮藏及保存期

储藏条件：试剂盒于 2-8°C 保存，避免冷冻。

保质期：该产品有效期为 1 年，生产日期见包装盒。