仅供科研使用，不得用于临床检验。

三聚氰胺（MEL）检测试剂盒（ELISA）说明书

【产品名称】

通用名称：三聚氰胺（MEL）检测试剂盒（ELISA）

【包装规格】

48 / 96 人份/盒

【预期用途】

仅供科研使用，定量检测奶粉、牛奶、组织、饲料、蛋类、血清等样本中的三聚氰胺（MEL）的残留量。

【检验原理】

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。

【主要组成成分】

主要成分

组分	数量	主要成分
包被微孔板	48T / 96T	预包被固相抗体
标准品	1.0 mL×6 管	
高标准品	1.0 mL	
HRP 标记物	3mL/5.5mL	HRP 标记的检测抗体
抗体工作液	3mL/5.5mL	
底物液 A	6mL	过氧化脲工作液
底物液 B	6mL	TMB 工作液
终止液	6mL	--
20×浓缩洗涤液	40mL	含 0.15%Tween20 的 PBS
2×复溶液	50mL	
说明书	1 份	--
自封袋	1 个	--
不干胶	2 片	--

标准品浓度从高到低依次为：162ppb、54ppb、18ppb、6ppb、2ppb、0ppb

需要但未提供的材料及耗材

1、酶标仪

2、精密移液器及一次性吸头

3、蒸馏水

4、洗瓶或者自动洗板机

5、25℃水浴锅或恒温箱

6、500ml 量筒

7、无粉一次性乳胶手套

8、乙腈、氢氧化钠、浓盐酸、正己烷、甲醇

【储存条件及有效期】

1、2-8℃保存，切勿冷冻，有效期 6 个月。

2、开封使用后，包被微孔板放入带有干燥剂的自封袋中，密闭自封袋，并将全部试剂放回 2-8℃冰箱。

3、开封后，按照建议的条件保存，校准品、包被微孔板和 HRP 标记抗体，有效期为 14 天，其他成分在标签标明的有效期内是稳定的。

【适用仪器】

半自动的酶标仪，如 Thermo MK3，或者国产酶标仪。

【样本要求】

样本前处理

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。

2、配液

配液 1：1M HCl 溶液

取 8.6ml 浓 HCl 加去离子水混匀，定容至 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 加去离子水混匀溶解，定容至 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×复溶液用去离子水 2 倍稀释(1 份 2×复溶液加 1 份去离子水)，用于样本的复溶，复溶液在 4℃环境可保存一个月。

配液 6:工作洗涤液

将浓缩洗涤液 20 倍稀释(1 份洗涤液加 19 份去离子水)。

3、样本前处理步骤：

1、 牛奶专用样本处理方法：

1)取牛奶样本 600μl 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 100μl 上清液，加入 900μl 复溶液，混匀;

3）取 50 μl 用于分析。

牛奶样本稀释倍数：27　　检测下限：54ppb

2、奶粉专用样本处理方法：

1）称取 2.0±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 100μl 上清液，再加入 900μl 复溶液，混匀；

3）取 50μl 用于分析。

奶粉样本稀释倍数：20　　检测下限：40ppb

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℃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 50μl 用于分析。

样本稀释倍数：1　　检测下限：2ppb

4、组织（鸡/猪/鸭/鱼/虾/肝脏）样本处理方法：

1）取 2.0±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℃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 50μl 用于分析。

样本稀释倍数：2　　检测下限：4ppb

5、饲料样本处理方法：

1）将饲料样品研碎，称 2.0±0.05g 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 100μl 上清液加入 900μl 复溶液，混合均匀）；

6）取 50μl 进行分析。

样本稀释倍数：100　　检测下限：200ppb

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±0.05g 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℃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（50μl 样本液加 150μl 复溶液），混合 30s；

6）取 50μl 用于分析。

样本稀释倍数：20　　检测下限：40ppb

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℃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 50μl 用于分析。

样本稀释倍数：4　　检测下限：8ppb

【检验方法】

试剂准备

1、使用前，所有的组分都要至少复温 30min，确保充分复温到室温。

2、浓缩洗涤液：从冰箱取出的浓缩洗涤液，会有结晶产生，这属于正常现象，水浴加热使结晶完全溶解。浓缩洗涤液与蒸馏水，按 1:20 稀释，即 1 份的浓缩洗涤液，添加 19 份的蒸馏水。

操作程序

1、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。

2、加标准品或样本 50μl/孔到各自的微孔中，然后加酶标记物 50μl/孔，再加入 50μl/孔的抗体工作液，用盖板膜封板，轻轻振荡 5 秒混匀，25℃反应 30 分钟

3、小心揭开盖板膜，甩去孔内液体，每孔加 350ul 工作洗涤液，静置 30 秒后弃去，重复洗涤 5 次，最后一次拍干（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）。

4、每孔加入底物液 A 50μl，再加底物液 B 50μl，轻轻振荡 5 秒混匀，25℃避光显色 15 分钟（若蓝色过浅，可适当延长反应时间）。

5、每孔加入终止液 50μl，轻轻振荡混匀，终止反应。

6、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。

【检验结果的解释】

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（0ppb）的吸光度值，再乘以 100%，即

$$\text{百分吸光度值（\%）} = \frac{A}{A0} \times 100\%$$

A—标准溶液或样本溶液的平均吸光度值

A0—0ppb 标准溶液的平均吸光度值

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。

【检验方法的局限性】

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

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。

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。

4、在所有孵育过程中，用盖板膜封住微孔板，避免光线照射。

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。

6、显色液若有任何颜色表明变质，应当弃之。

7、反应终止液有腐蚀性，避免接触皮肤。

【产品性能指标】

1、物理性能

试剂盒的各液体组分应澄清透明、无沉淀或者絮状物。微孔板铝箔袋应真空包装，无破损漏气。

2、剂量反应曲线线性

校准品剂量反应曲线相关系数 r 值，大于等于 0.9900。

3、精密度

批内精密度：三组已知的高、中、低浓度样品，进行二十次在同一个板块内精度评估。批内变异系数 CV%小于 10%。

批间精密度：三组已知的高、中、低浓度样品，进行二十次在不同板块内精度评估。批间变异系数 CV%小于 15%。

4、试剂盒灵敏度：**2ppb(ng/ml)**

5、反应模式：**25℃，30min～15min**

6、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

7、交叉反应率：

三聚氰胺……100%

三聚氰酸……60%

三嗪、三嗪二铵……<1%

8、样本回收率：

牛奶、奶粉……90%±20%

组织……85%±20%

饲料……85%±20%

蛋类……80%±20%

【注意事项】

生物安全

1、检测必须符合实验室管理规范的规定，严格防止交叉污染，所有样品、洗弃液和各种废弃物都应按照传染物进行处置。

2、试剂盒的液体组分中，含有 proclin-300 防腐剂，可能引起皮肤过敏反应，避免吸入烟雾与皮肤接触。

3、底物液对皮肤、眼睛和上呼吸道有刺激作用，避免吸入烟雾。戴上防护手套，实验完成后彻底洗手。

技术提示

1、混合蛋白溶液时，避免起泡。

2、加校准品与样本时，每个校准品浓度和样本都要更换移液枪头，公共组分应该悬臂加样，避免交叉污染。

3、合适的温育时间，和充分的洗涤步骤，是保证实验结果准确性的必要条件。

4、底物溶液为无色液体，保存过程中变为蓝色，代表底物溶液已经失效，不得使用。

5、终止液加样顺序与底物溶液加样顺序一致，加入终止液后，蓝色底物产物，会瞬间变为黄色。

6、实验中，用剩的板条，应立即放回自封袋中，密封（低温干燥）保存。

7、所有液体组分，使用前充分摇匀，严格按照说明书标明的时间、加样量及加样顺序进行温育操作。

废物处理

所有使用或未使用的试剂，所有污染性的一次性材料，应当遵循传染性或潜在传染性产品的处理程序，每个实验室都有责任根据其实验的类型和危险性级别，进行废物和污物的处理，同时要严格依照有关规定对待所有的废物和污物。