



三聚氰胺(MEL) ELISA 定量检测 试剂盒说明书

Catalog Number: ml103860

产品仅供教研使用

用于定量检测蛋、饲料、肉/鱼、牛奶、奶粉、婴儿配方粉、巧克力、酸奶、黄油、酸乳等样本中的三聚氰胺的残留量

使用本产品之前，必须完整阅读本说明书，仅供科研使用。

简介	3
检测原理	3
检测实验的局限性	4
操作要点	4
试剂盒组成及储存条件	5
需要的其他材料	6
注意事项	6
样品预处理	6
试剂准备	6
实验步骤	11
结果的计算	13
示例数据	13
精密度	13
回收率	14
灵敏度	14
线性关系	14
交叉反应性	14
参考文献	14

生产企业:

上海酶联生物科技有限公司

上海市松江区云凯路66号临港科技绿洲2期T2栋1603

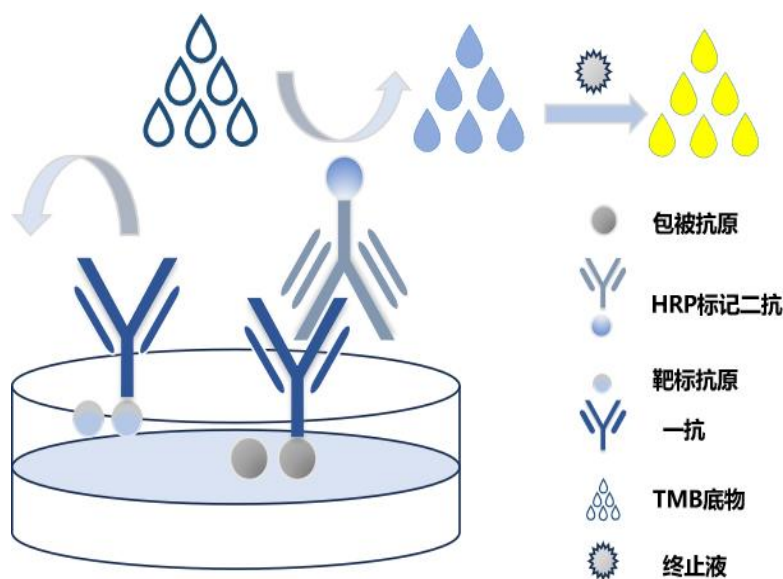
简介

三聚氰胺 (Melamine) 俗称密胺、蛋白精、蜜胺，是一种三嗪类含氮杂环有机化合物，被广泛应用于塑料、涂料、纺织、医药等领域。三聚氰胺的氮含量比蛋白质还高，因此食品中添加此种物质，检测食品蛋白质含量时，就会误把三聚氰胺当成蛋白质，从而增强食品中蛋白质的营养水平。三聚氰胺影响婴儿的尿道、肾小管和血管，引发结晶尿、尿道上皮细胞炎症、肾结石和急性肾功能衰竭。尿酸与三聚氰胺结合形成结晶，婴儿的肾小球滤过率低，尿流减少，促进结晶集聚，导致肾结石，对婴儿肾脏功能造成严重损害。其营养含量较低，长期食用影响婴幼儿的身体发育，造成营养不良，出现大头娃娃。

本酶联免疫检测试剂盒可以经济、快速地检测蛋、饲料、肉/鱼等样品中的三聚氰胺的残留量。

检测原理

本试剂盒采用间接竞争 ELISA 方法，在酶标板微孔条上预包被偶联抗原，样本中 MEL 和微孔条上预包被的偶联抗原竞争 MEL 抗体，加入酶标二抗后，形成包被抗原-抗体-酶标二抗复合物。随后结合的酶催化 TMB 底物显色，样本吸光值与其含有的 MEL 成负相关。通过标准曲线可准确定量样品中 MEL 的含量。通过标准曲线计算所得值乘以样品处理的稀释倍数即为实际样品中 MEL 的含量。



◀间接竞争法模式图

按操作顺序形成包被抗原-抗体-酶标二抗复合物后，加入TMB底物，板孔液体由无色变成蓝色，再加入终止液液体变为黄色后进行吸光度值测定。

检测实验的局限性

仅供科研使用。

试剂盒的使用期限不得超过试剂盒标签上的有效期。不要将试剂与其他批次或来源的试剂混合使用或替换使用。

如果样品产生的值高于最高标准，则用测定稀释剂进一步稀释样品，并重复测定。稀释剂、操作人员、移液技术、洗涤技术、培养时间或温度以及试剂盒使用年限的任何变化都可能导致结合变化。

样本采集、处理和存储的变化可能会导致样本值的差异。

本试剂盒实验设计消除了不同样品中可能潜在的干扰因素的影响，但不能涵盖所有潜在影响因素。不能排除存在其他干扰的可能性。

操作要点

为了避免交叉污染,在添加每个标准品、样品和试剂时应更换移液器枪头。

当使用自动洗板机时,在加入洗涤缓冲液后加入30秒的浸泡期,或者在洗涤步骤之间将板旋转180度,可以提高测定精度。

显色剂应保持无色,直到添加到板中。确保显色剂不受光线照射。

应按照与显色剂相同的顺序将终止液添加到板中。加入终止液后,孔中形成的颜色将从蓝色变为黄色。蓝色的孔表示终止液未与溶液充分混合。

试剂盒组成及储存条件

名 称	规格 (48T)	规格 (96T)	储 存 条 件
预包被酶标板	8×6 条	8×12 条	剩余置于 2-8℃储存至多 1 个月
标准品	1 支×100μL	1 支×200μL	剩余置于-20℃储存至多 6 个月
100×一抗试剂	1 支×50μL	1 支×100μL	剩余置于-20℃储存至多 6 个月
100×酶标抗体	1 支×50μL	1 支×100μL	
20×浓缩稀释液	1 支×15mL	1 支×25mL	置于 2-8℃可保存至有效期末
显色剂 A	1 支×3mL	1 支×6mL	
显色剂 B	1 支×3mL	1 支×6mL	
终止液	1 支×3mL	1 支×6mL	
20×浓缩洗涤液	1 支×15mL	1 支×25mL	
封板膜	2 张	2 张	
产品说明书	1 份	1 份	

需要的其他材料

- 酶标仪，包含450nm测定波长，同时包含600-680nm校正波长更佳；
- 移液器及枪头；
- 蒸馏水或去离子水；
- 100-1000mL刻度量筒；
- 洗瓶、排枪或自动微孔板清洗机；
- 水平轨道微孔板振荡器，能够保持 500 ± 50 rpm的速度；
- 用于稀释标准品和样品的试管。

注意事项

此试剂盒提供的终止液为稀硫酸溶液，具有一定腐蚀性，应谨慎操作。

该试剂盒中的某些成分含有防腐剂，可能会引起皮肤过敏反应，应佩戴口罩避免吸入薄雾。

显色剂B可能会引起皮肤、眼睛和呼吸道刺激，应佩戴口罩避免吸入薄雾。

佩戴防护手套、防护服、眼睛和面部防护用品。处理后彻底洗手。

样品预处理

下面列出的样品收集和储存条件旨在作为一般性指导。样品稳定性尚未评估。

样品保存在 $2-4^{\circ}\text{C}$ 不超过 1-2 天，如果需要保存较长的时间，应该放置 -20°C 。样品使用前应恢复到室温。

1×样品提取液：1(10×样品提取液)：9(蒸馏水)

1×样品稀释液: 1(10×样品稀释液): 9(蒸馏水)

1×牛奶萃取液: 1(10×牛奶萃取液): 9(蒸馏水)

蛋

- (1) 研磨并混匀适量的样品; 称取 1g 磨碎的样品, 放入适当的容器中;
- (2) 加入 4mL 1×样品提取液, 振荡 5 秒, 再加入 250uL 清洗液, 最大转速漩涡振荡 3min。
- (3) 室温 (22.5 ± 2.5) °C 4000 rpm 离心 10 分钟;
- (4) 取上清 300μL 于干净管中, 加入 300μL 1×样品平衡溶液和 1ml 的正己烷。
- (5) 涡流 15 秒, 4000xg 离心 2 分钟。
- (6) 出去正己烷层, 每孔取 50 μL 下清液, 进行样品测试。

稀释倍数: 11

饲料

- (1) 研磨并混匀适量的样品;
- (2) 称取 0.5g 磨碎的样品, 放入适当的容器中;
- (3) 加入 5mL 1×样品提取液, 振荡 5 秒, 再加入 250uL 清洗液, 最大转速漩涡振荡 3min。
- (4) 室温 (22.5 ± 2.5) °C 4000 rpm 离心 10 分钟;
- (5) 取上清 250μL 于干净管中, 加入 250μL 1×样品平衡溶液。
- (6) 涡流 15 秒, 4000xg 离心 2 分钟。
- (7) 每孔取 50 μL 下清液, 进行样品测试。

稀释倍数: 22

如样品浓度过高, 在 (5) 可适当的增加 1×样品稀释液的量, 例如, 另外添

加 500 μ L 1 $\times$ 样品稀释液，则稀释倍数为 44 倍。

肉/鱼

- (1) 称取 1g 磨碎的样品，放入适当的容器中；
- (2) 加入 4mL 1 $\times$ 样品提取液，摇匀 5 秒，再加入 250 μ L 清洗液，最大转速漩涡振荡 3min。
- (3) 室温 (22.5 $\pm$ 2.5) $^{\circ}$ C 4000 rpm 离心 10 分钟；
- (4) 取上清 250 μ L 于干净管中，加入 250 μ L 1 $\times$ 样品平衡溶液。
- (5) 涡流 15 秒，4000 $\times$ g 离心 2 分钟。
- (6) 每孔取 50 μ L 下清液，进行样品测试。

稀释倍数：11（适用于 0.2-2.0ppm 的添加回收）

为了检测高浓度的样品，可以在第 4 步通过增加 1 $\times$ 样品稀释液来提高稀释倍数，例如：加 500 μ L 1 $\times$ 样品稀释液，稀释倍数是 22（适用于 0.4-4.0ppm 添加回收）。

牛奶

- (1) 取 1mL 样品，加入 4 mL 1 $\times$ 样品提取液，摇匀 5 秒，再加入 250 μ L 清洗液，最大转速漩涡振荡 30s 或手动摇匀 3min。
- (2) 常温 4000g 离心 10min。
- (3) 取 250 μ L 上清于干净管中，加入 250 μ L 1 $\times$ 样品平衡溶液。
- (4) 涡流 15 秒，4000 $\times$ g 离心 2 分钟。
- (5) 取 50 μ L 作检测。

稀释倍数：11（适用于 0.2-2.0ppm 的添加回收）

为了检测高浓度的样品，可以在第 4 步通过增加样品稀释液来提高稀释倍数，例如：加 500 μ L 1 $\times$ 样品稀释液，稀释倍数是 22（适用于 0.4-4.0ppm 添加回

收)。

奶粉/婴儿配方奶粉

- (1) 取 1g 奶粉,加入 4mL 1x 样品提取液, 涡流 30 秒匀质化样品。
- (2) 加入 250uL 清洗液, 最大转速漩涡振荡 30s 或手动摇匀 3min。
- (3) 常温 4000g 离心 10min。
- (4) 取 100uL 上清液于干净管中, 加入 100uL 1×样品平衡溶液。
- (5) 涡流 15 秒, 4000xg 离心 2 分钟。
- (6) 取 50μL 作检测。

稀释倍数: 11 (适用于 0.2-2ppm 的添加回收)

为了检测高浓度的样品, 可以在第 4 步通过增加 1x 样品稀释液来提高稀释倍数, 例如: 加 800uL 1x 样品稀释液, 稀释倍数是 55 (适用于 0.6-10ppm 添加回收)。

巧克力

- (1) 在玻璃管中称取 1g 巧克力样品, 加入 5ml 1x 样品提取液, 在 50°C 水浴中孵育 2-3 分钟, 最大转速涡流 30 秒匀质化样品。
- (2) 加入 250uL 清洗液, 最大转速漩涡振荡 30s 或手动摇匀 3min。
- (3) 常温 4000g 离心 10min。
- (4) 取 100uL 上清液于干净管中, 加入 100uL 1×样品平衡溶液。
- (5) 涡流 15 秒, 4000xg 离心 2 分钟。
- (6) 取 50μL 作检测。

稀释倍数: 11 (适用于 0.2-2ppm 的添加回收)

为了检测高浓度的样品, 可以在第 4 步通过增加 1x 样品稀释液来提高稀释倍数, 例如: 加 500uL 1x 样品稀释液, 稀释倍数是 22 (适用于 0.4-4ppm 添

加回收)。

酸奶/黄油/酸乳

- (1) 称取 0.5g 样品, 加入 0.5ml 1x 牛奶提取液, 混匀。最大转速漩涡振荡 30s 或手动摇匀 3min。
- (2) 常温 4000g 离心 10min。
- (3) 取 200uL 上清液于干净管中, 加入 800uL 1×样品稀释溶液。
- (4) 涡流 15 秒, 4000xg 离心 2 分钟。
- (5) 取 50μL 作检测。

稀释倍数: 10 (适用于 0.2-2ppm 的添加回收)

为了检测高浓度的样品, 可以在第 4 步通过增加 1x 样品稀释液来提高稀释倍数

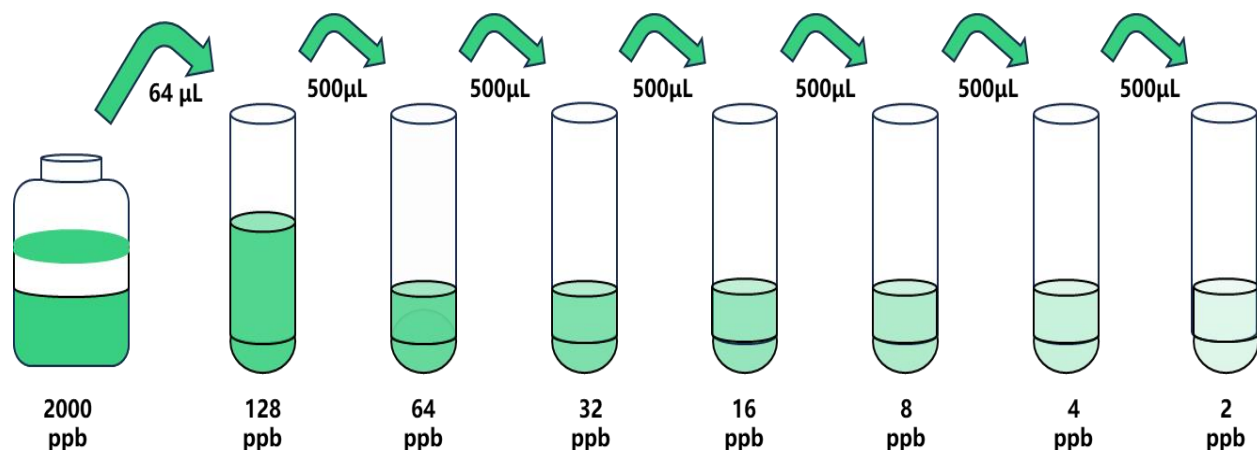
试剂准备

使用前将所有试剂置于室温平衡30分钟左右。

洗涤液/稀释液配制: 如果洗涤液/稀释液 (20×) 有晶体析出, 需在37℃下加热至晶体全部溶解。用蒸馏水1:20稀释 (例如: 1mL 浓缩洗涤液加入 19mL的蒸馏水)

标准品配制: 试剂盒中取出标准品, 准备7个试管, 先将2000 ppb标准品 (200μL) 按需吸取一定量用1×稀释液稀释至128 ppb (例: 64μL的标准品母液+936μL的1×稀释液, 制备得到1000μL的128 ppb浓度标准品), 随后在6个试管中分别加入500μL的1×稀释液, 在这6个单独的试管中将128 ppb标准品依次2倍倍比稀释至6个梯度, 共配制7个浓度的标准品, 依次为:

128 ppb、64 ppb、32 ppb、16 ppb、8 ppb、4 ppb、2 ppb，从最高浓度标准品溶液中吸取500 μ L标准品到下一个试管中，轻轻吹打混匀，以此类推进行标准品的倍比稀释（如图所示），1 $\times$ 稀释液用作零浓度标准品(0ppb)。



一抗工作液配制：使用前10分钟，用1 $\times$ 稀释液将100 $\times$ 一抗工作液稀释成1 $\times$ 一抗工作液，根据所需用量配置。

酶标二抗工作液配制：使用前10分钟，用1 $\times$ 稀释液将100 $\times$ 酶标二抗稀释成1 $\times$ 酶标抗体工作液，根据所需用量配置。

备注：如样本中待测物浓度高于标准品最高值，请根据实际情况选择适当的稀释倍数（建议：将待测样本用样品稀释液最低稀释1倍，在正式实验之前做预实验，以确定具体稀释倍数）；标准品母液及100 $\times$ 酶标二抗溶液根据实验所需酶标板孔数吸取一定量配制工作液，剩余溶液应放回-20 $^{\circ}$ C储存，且避免反复冻融。（若实验在1-2周内做完，标准品母液及100 $\times$ 酶标抗体置于2-8 $^{\circ}$ C保存；若实验为长时间跨度实验，建议将标准品母液及100 $\times$ 酶标抗体置于-20 $^{\circ}$ C保存，以保证实验结果的稳定性）

实验步骤

所有标准品、样品建议复孔检测

1. **样本孵育**: 每孔分别加入 50 μ L 不同浓度的标准品/预处理过的待测样品, 同时加入抗试剂 50 μ L/孔 (加抗试剂时请使用多道移液器), 盖上封板膜在 37°C 下孵育 30 分钟。孵育结束后, 每孔加入 300 μ L 1 $\times$ 洗涤缓冲液, 轻轻晃动 30 秒, 甩干并在纸上拍干, 以这种方式清洗 3 次。
2. **二抗孵育**: 每孔加入 100 μ L 酶标抗体工作液, 轻轻混匀, 盖上封板膜在 37°C 下避光孵育 30 分钟。孵育结束后, 重复步骤 1 中的清洗方式清洗 4 次。
3. **底物显色**: 每孔首先加入 50 μ L 显色液 A, 随后加入 50 μ L 显色液 B, 轻轻混匀, 盖上封板膜在 37°C 下避光孵育 15 分钟。(加显色液时请使用多道移液器, 根据样品和对照抗体的颜色, 自行控制显色时间)
4. **终止反应**: 待显色反应结束后, 每孔加入 50 μ L 终止液 (加终止液时请使用多道移液器), 轻轻混匀, 5 分钟内用预热完成的酶标仪在 450nm 处测吸光值。

实验步骤汇总

1. 加标准品/样品和一抗, 37°C 反应 30 分钟, 洗涤 3 次。
2. 加酶标二抗, 37°C 反应 30 分钟, 洗涤 4 次。
3. 加显色液, 37°C 避光反应 15 分钟。
4. 加终止液, 在 5 分钟内读数。

结果的计算

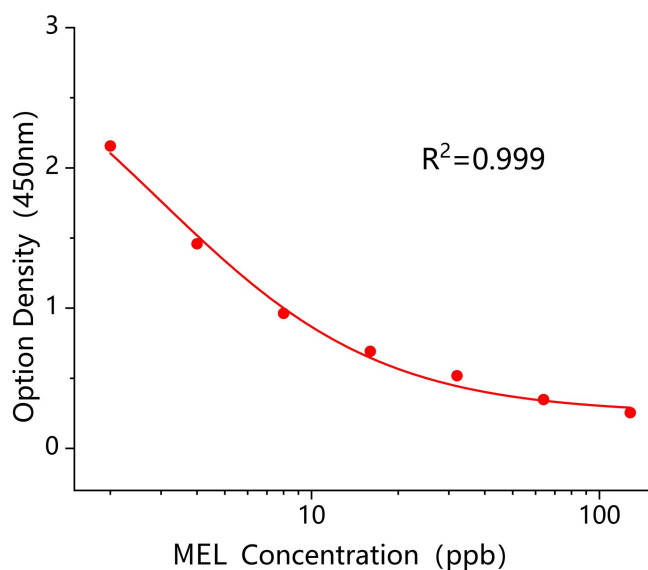
以浓度的对数为横坐标，OD 值为纵坐标，绘出四参数逻辑函数的标准曲线。或者使用能够生成四参数逻辑（4-P）曲线拟合的计算机软件来创建标准曲线。

若样品 OD 值高于标准曲线上限，应适当稀释后重测并在计算样本浓度时乘以相应的稀释倍数。

示例数据

以下数据和曲线仅供参考，实验者需根据自己的实验数据建立标准曲线。

标准品浓度 (ppb)	128	64	32	16	8	4	2	0
校正 OD 值	0.215	0.348	0.518	0.692	0.963	1.459	2.157	3.286



本图所示标准曲线仅供示例，结果计算应以同次试验标准品所绘标准曲线为准计算样本结果。

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%。

回收率

样本回收率：80%-120%

灵敏度

经样本测试，本试剂盒的检测灵敏度为2 ppb。

线性关系

校准品剂量反应曲线相关系数 r 值，大于等于 0.999。

交叉反应性

三聚氰胺：100%

ELISA Plate Template											
	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11 12
A											
B											
C											
D											
E											
F											
G											
H											