



饲料及奶制品三聚氰胺快速检测 ELISA 试剂盒

使用说明书（中文版）

产品编号：AAF-21104

【概述】

三聚氰胺，俗称“蛋白精”，是一种低毒、无味的纯白色单斜棱晶体，属于三嗪类含氮杂环有机化合物，广泛应用于塑料、染料、化肥的生产和纺织行业。由于三聚氰胺分子含氮量很高，只要添加到食品中就可检测中造成蛋白质含量较高的假象。三聚氰胺中常常混有三聚氰酸，当摄入人体后三聚氰胺和三聚氰酸相互解离并被分别通过小肠吸收进入血液并最后进入肾脏，在肾细胞中两者再次结合沉积从而形成肾结石，堵塞肾小管，最终造成肾衰竭。现有的检测三聚氰胺方法如液相色谱-质谱联用法、电喷射离子质谱技术等样品前处理复杂，所需仪器昂贵，操作复杂且耗费时间。而使用三聚氰胺 ELISA 试剂盒能够既快速又准确的分析样品中三聚氰胺含量。

本试剂盒是应用 ELISA 技术开发的三聚氰胺酶联快速检测试剂盒，适用于饲料以及牛奶、奶粉和酸奶等奶制品，具备快速（整个检测过程仅需 30 分钟），简便（奶制品不需经过任何前处理或稀释，直接进行分析，饲料仅需研碎后用水浸泡，反应试剂除浓缩洗涤液外不需进行稀释等操作），灵敏度高等特点，是目前国内和国际市场上各个方面均处于领先地位的产品。

【用途】

本试剂盒用于定量、定性检测饲料及牛奶、奶粉和酸奶等奶制品中三聚氰胺的含量。饲料样品检测灵敏度为 200 ppb，奶制品样品检测灵敏度为 1 ppb（1 ng/ml）。

【检测原理】

本试剂盒是利用免疫分析直接竞争法的原理，在微孔板上预包被抗三聚氰胺抗体。检测时，加入三聚氰胺标准品或待测样品溶液及辣根过氧化物酶（HRP）标记的三聚氰胺（标记物），标记物将和标准品或样品中的三聚氰胺竞争性地与抗体结合。洗涤后用酶底物（TMB）系统显色，样本吸光值与其中所含三聚氰胺量成负相关，与标准曲线比较后即可得出样品中的三聚氰胺准确含量。

【试剂盒组成成份】

每一试剂盒中的试剂足够进行 96 个测量（包括标准分析孔）。盒中的材料如下：

- | | |
|--|------------|
| 1. 抗三聚氰胺抗体包被微孔板（可分为 12 条使用） | 8 孔×12 条 |
| 2. 三聚氰胺标准品 6 瓶，为三聚氰胺标准溶液：
A. 0 ng/mL; B. 5 ng/mL; C. 20 ng/mL; D. 80 ng/mL; E. 320 ng/mL; F. 1280 ng/mL | 每瓶 0.5 ml |
| 3. 三聚氰胺浓缩样品 1 瓶 装(5ug/ml) | 0.5 ml×1 瓶 |
| 4. 样品稀释液 | 10 mL×1 瓶 |



5. HRP 标记三聚氰胺 (1×)	10 mL×1 瓶
6. 微孔板洗涤液 (10×)	40 mL×1 瓶
7. 显色液 (1×)	11 mL×1 瓶
8. 终止液 (1×)	11 mL×1 瓶
9. 封板膜	3 张
10. 自封塑料袋	1 个

【使用单位所需仪器】

1. 96 微孔板酶标仪，检测波长 450nm，参考波长 630nm。
2. 20 μL—200 μL 微量加样器；300 μL 多道加样器。
(不需任何其它试剂)

【检测步骤】

- * 使用前将试剂盒置于室温 (20—25℃) 平衡 30 min 以上，注意每种液体试剂使用前均须摇匀。
- * 取出需要数量的酶标板微孔条插入框架中，将不用的微孔条放入自封袋，保存于 2—8℃ 不要冷冻。
- * 编号：将样品和标准品对应微孔按序编号，每个样品和标准品均需做二复孔。

奶制品不需进行样品前处理，检测奶粉样品时，称取 1g 奶粉溶于 6 mL 水，此浓度相当于原奶。

饲料样品研碎成粉末或小颗粒，称取 1g，加水 10 ml，混匀，在室温下静置浸泡 15 分钟。取上清液 10 μL 加 190 μL 样品稀释液，混匀。此浓度相当于饲料样品稀释 200 倍。

1. 加样：用加样器每孔加标准品或样本 20 μL。
2. 加酶标记物：用加样器每孔加 HRP 标记三聚氰胺 80 μL。
3. 温育：轻轻振荡混匀，用盖板膜封板后在室温 (20—25℃) 反应 20 min。
4. 洗板：稀释适量 20× 微孔板洗涤液至 1×，倒掉反应液，每孔加入微孔板洗涤液 200 μL，倒掉后重复，共清洗 4 次，最后拍干。
5. 显色：每孔加入显色液 100 μL，轻轻振荡混匀，室温 (20—25℃) 避光显色 10 min。
6. 测定：每孔加入终止液 100 μL，轻轻振荡混匀，设定酶标仪于 450nm，测定每孔吸光度值 (OD₄₅₀ 值)。

【结果判定】

结果判定有两种方法，粗略判定可用第 1 种方法，定量判定用第 2 种方法。注意样本吸光值与其所含三聚氰胺成负相关。

1. 定性检测

用样品的平均吸光度值与标准值比较即可得出其浓度范围 (ng/mL 或 ppb)。假设样品 1 的吸光度值为 0.6，样品 2 的吸光度值为 1.2，标准液吸光度值分别是：0 ng/mL 为 2.300；5 ng/mL 为 2.000；20 ng/mL 为 1.650；800 ng/mL 为 0.950；320 ng/mL 为 0.400；1280 ng/mL 为 0.165。则样品 1 的浓度范围是 80-320 ng/mL；样品 2 的浓度范围是 20-80 ng/mL。

2. 定量测定



a) 计算 B/B_0

所获得的每个浓度标准溶液和样本吸光度值的平均值 (B) 除以第一个标准品 A (零标准品) 的吸光度值 (B_0) 再乘以 100%，即百分吸光度值。

$$\text{百分吸光度值 (\%)} = B/B_0 \times 100\%$$

B — 标准溶液或样本溶液的平均吸光度值

B_0 — 0 ng/mL 标准溶液的平均吸光度值

b) 绘制标准曲线，计算样本中三聚氰胺浓度

以三聚氰胺标准品浓度为 X 轴，对应的百分吸光度值为 Y 轴，在半对数坐标纸上绘制标准曲线图。相对应每一个样品的浓度可以从标准曲线上读出。也可以用回归方程法，计算出样本溶液浓度。利用计算机专业软件，更便于大量样品的快速分析。

【产品技术指标】

标准曲线范围：0—1280 ng/mL

试剂盒定量区间：5—1280 ng/mL

检测时间：30 分钟

样本最低检测限：

牛奶.....	1 ppb
奶粉（以原奶计）.....	1 ppb
酸奶.....	1 ppb
饲料.....	200 ppb

回收率：

牛奶，奶粉，酸奶.....	85—115%
饲料.....	87—94%

特异性：

三聚氰胺.....	100%
-----------	------

灵敏度 (Sensitivity, 定义为 6 个零标准品吸光度值的平均值减去 3 倍标准方差所对应的浓度)：

1 ng/mL (1 ppb)

精密度 (Precision)：

板内变差系数 (Intra-assay CV)

样品浓度 1000 ng/mL: 5.8%

样品浓度 100 ng/mL: 5.2%

样品浓度 10 ng/mL: 12.7%

板间变差系数 (Inter-assay CV)

样品浓度 1000 ng/mL: 6.1%

样品浓度 100 ng/mL: 7.2%

样品浓度 10 ng/mL: 17.9%

有效中浓度 (EC50)：30 ng/mL (变差系数 7.1%)



回收率 (Spiking Recovery) :

6 种牛奶样品和 5 种奶粉样品中所加入三聚氰胺的平均回收率

样品浓度 500 ng/mL (500 ppb): 93.6%

样品浓度 50 ng/mL (50 ppb): 95.5%

狗饲料 (干), 狗饲料 (湿), 猫饲料 (干), 猫饲料 (湿) 样品中所加入三聚氰胺的平均回收率

样品浓度 25 ppm: 92.2%

样品浓度 10 ppm: 87.7%

样品浓度 5 ppm: 94.0%

准确度 (Accuracy) :

样品浓度 1000 ng/mL: 平均实际测定结果 1060.9 ng/mL (106.1%)

样品浓度 100 ng/mL: 平均实际测定结果 102.1 ng/mL (102.1%)

样品浓度 10 ng/mL: 平均实际测定结果 10.2 ng/mL (101.5%)

【注意事项】

1. 保存试剂盒于 2—8℃, 不要冷冻; 将不用的微孔板放进自封袋重新密封; 无色的显色液对光敏感, 因此要避免直接暴露在光线下。
2. 使用之前将所有试剂温度回升至室温 (20—25℃)。室温低于 20℃或试剂及样本没有回到室温可能导致所有样品的 OD 值偏低。使用之后立即将所有试剂放回 2—8℃冰箱。
3. 严格控制反应温度和时间, 并尽量使用移液器加样; 结果判定以酶标仪读数为准。
4. 试剂混合要均匀, 否则会出现重复性不好的现象。
5. 在所有恒温孵育过程中, 避免光线照射, 用封板膜封住微孔板。
6. 在洗板过程中如果出现板孔干燥的情况, 则会伴随着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。
7. 反应终止液为 1N 硫酸, 应避免接触皮肤和衣物。
8. 不要使用过了有效日期的试剂盒, 稀释或掺杂使用会引起灵敏度、OD 值的变化。不要交换使用不同批号的盒中试剂。
9. 显色液若有任何颜色表明变质, 应当弃之。当零标准品的吸光度值小于 0.8 时, 表示试剂可能变质。

【存储条件和有效期】

贮存条件: 在 2—8℃保存试剂盒。

有效期: 本试剂盒有效期为 12 个月。

本产品仅供研究使用。