

美国 Beacon 三聚氰胺试剂盒说明书

适用

Beacon 三聚氰胺检测试剂盒是利用酶联免疫吸附测定法用于食品及饲料中三聚氰胺的定量测定。

检测原理

酶联免疫吸附测定法定量测定三聚氰胺残留。利用萃取液通过均质及振荡的方式提取样品中的三聚氰胺进行免疫测定。先将三聚氰胺酶标记物, 样品萃取物及标准加入到已经包被有三聚氰胺抗体的微孔中开始反应。在 30 分钟的孵育过程中, 样品萃取物中的三聚氰胺与三聚氰胺酶标记物竞争结合微孔中的三聚氰胺抗体, 孵育 30 分钟后洗掉小孔中所有没有结合三聚氰胺及三聚氰胺酶标记物。再用去离子水清洗结束后, 每孔中加入清澈的底物溶液, 结合的酶标记物将无色的底物转化为蓝色的物质。孵育 30 分钟后停止此反应, 根据各孔颜色深浅进行数据读取。依据标准的颜色得出样品中三聚氰胺的浓度值。

提供试剂及材料

试剂盒在 2—8℃ 贮存 (不要冷冻), 请于盒上标注日期前用完。

- 1、真空包装微孔板 (8×12 条)。
- 2、4 瓶三聚氰胺标准液 2mL, 浓度分别为 0, 20, 100, 500ug/L (ppb)。
- 3、1 瓶 7 mL 三聚氰胺酶标记物
- 4、1 瓶 14 mL 底物。
- 5、1 瓶 14 mL 停止液。(注意: 1N 盐酸, 勿接触皮肤!)
- 6、操作说明书。

注意事项

- 1、最好配套使用 Beacon 所提供的试剂, 不要同其它公司的产品混用, 不要将不同批次的产品混用。
- 2、样品稀释或含有杂质很可能对结果的准确性有影响。
- 3、不要使用过期的产品。
- 4、使用之前将所有试剂回升至室温 20-28℃, 但不要放置超过 24 小时。
- 5、三聚氰胺属于有毒性的化学品, 请小心处理。
- 6、停止液是 1N 盐酸, 避免接触皮肤。

试剂盒未提供的材料

- 1、蒸馏水或去离子水。
- 2、可吸取 50ul 的移液器及吸头。
- 3、可吸取 50ul 和 100ul 的八道移液器及吸头。
- 4、吸水纸或相当的吸水材料。
- 5、450nm 的酶标仪。
- 6、计时器。
- 7、20mM PBS: 0.62g NaH₂PO₄-2H₂O+5.73gNa₂HPO₄-12H₂O+9gNaCl, 蒸馏水定容至 1000ml。
- 8、清洗液: 0.62g NaH₂PO₄-2H₂O+5.73gNa₂HPO₄-12H₂O+9gNaCl, 蒸馏水定容至 1000ml.+0.5ml 土温 20

样品制备

湿的宠物食品萃取方法 (稀释倍数: 100)

- 1、均质样品至布丁状。
- 2、称取 2g 样品加入 10mL 60%甲醇/水溶液, 并剧烈振荡。
- 3、超声萃取 1 分钟。
- 4、漩涡混合 1 分钟, 然后静置 5 分钟, 使样品分层。
- 5、3000 g 室温离心 5 分钟。
- 6、用玻璃纤维滤纸过滤上清液, 并将萃取液收集于一干净试管中。
- 7、用样品稀释液将滤液 20 倍稀释 (如: 0.1mL 滤液+1.9mL 10%甲醇/20mMPBS)
- 8、移取 150 ul 进行分析。

注意: 用此方法测定了 8 个添加有 15ppm 三聚氰胺的猫粮(非要求召回), 回收率范围为 75%-117%。

本方法只可作为样品筛选方法, 不可作为最终确认方法。

小麦面筋蛋白萃取方法: (稀释倍数: 500)

- 1、均质或混匀小麦面筋蛋白样品。
- 2、称取 0.2g 均质好的样品加入 10mL 酸化的 60%甲醇/水溶液(1mL 1N HCl/ 100mL 60%甲醇/水)。
- 3、漩涡混合并超声萃取, 使样品溶解(确保样品中没有结块)。
- 4、用样品稀释液稀释萃取液按照 1:10 比例。(0.5mL+4.5mL 10%MeOH/20 mM PBS)。
- 5、10000 转/分离心上清液 10 分钟。
- 6、用 G6 玻璃纤维滤纸过滤上清液, 并将萃取液收集于一干净试管中。
- 7、移取 150 μ l 进行分析。

注意: 如果样品中含有大量的添加物, 需要加入更大的萃取溶液, 以保证萃取效率。

操作人依据自己的判断力, 如果测试结果比较高, 需要加入两倍的萃取溶液(0.2/20mL), 进行二次测定。

干的宠物食品萃取方法(稀释倍数: 200)

- 1、用均质器均质干的宠物饲料样品。
- 2、称取 1g 样品加入 10mL 60%甲醇/水溶液, 并剧烈振荡。
- 3、超声萃取 1 分钟。漩涡混合 1 分钟, 然后静置 5 分钟, 使样品分层。
- 4、3000 g 室温离心 5 分钟。
- 5、用 G6 玻璃纤维滤纸过滤上清液, 并将萃取液收集于一干净试管中。
- 6、用样品稀释液将滤液 20 倍稀释(如: 0.1mL 滤液+1.9mL 10%甲醇/20mPBS)
- 7、移取 150 μ l 进行分析。

免疫测定过程(注意: 标准及样品最好做平行试验以增加准确度)

- 1、将所有试剂及样品回升至室温 20-28℃, 但不要放置超过 24 小时。
- 2、从铝箔袋中拿出要求数量的微孔条, 放入干燥剂并重新封好袋子以免微孔条受潮。
- 3、吸取 150 μ l 标准、样品到对应微孔中, 必须保证每种溶液使用干净的吸头吸取, 避免交叉污染。
加入 50 μ l 三聚氰胺酶标记溶液到每个小孔中。
- 4、混合 60 秒, 20-28 摄氏度下孵育 30 分钟。
- 5、将微孔中的溶液倒入水槽中, 用清洗液完全充满微孔, 震荡后倒掉, 重复三次, 总共四次洗板。
- 6、在吸水纸上拍打, 尽可能将水拍干。
- 7、每个微孔中加入 100 μ l 底物溶液。
- 8、20-28 摄氏度下, 孵育 30 分钟。
- 9、每个微孔中加入 100 μ l 停止液。
- 10、450nm 下读板。

结果分析

- 1、半定量的结果是由样品的吸光率与标准的吸光率的简单对比而来判定: 样品的颜色比标准的颜色浅则三聚氰胺的浓度比标准样的浓度高, 样品的颜色比标准的颜色深则三聚氰胺的浓度比标准样的浓度低。
- 2、定量分析需要绘制以标准样的吸光率为 X 轴, 以标准样的浓度的半对数为 Y 轴的曲线图。依据标准样吸光率的点画成一直线, 如此样品的光吸收率可在线上找到, 与此相对应的 Y 轴则为样品的浓度, 样品光吸收率范围应比标准样的最底范围高, 比最高范围低, 即可说明此样品中三聚氰胺的含量大于 500ppb 或小于 20ppb。