

采用酶标法（ELISA）进行三聚氰胺检测

本实验方案采用 **Thermo Scientific** 的 **Multiskan MK3** 型酶标仪和 **Wellwash 4MK2** 型洗板机，结合 **Abraxis** 三聚氰胺检测试剂盒（由北京测迪科技有限公司提供），以竞争法测抗原的原理对液态奶或奶粉中的三聚氰胺进行检测分析。

一、样品准备

巴氏消毒全脂奶（液体）：

1) 用稀释液以 1:10 的比例稀释牛奶样品，如在 900 μl 的稀释液中加入 100 μl 牛奶。

婴幼儿配方奶粉：

1) 按照配方奶粉的说明，以稀释液溶解奶粉，如用 60 ml 稀释液溶解 8.6 克奶粉。

2) 用稀释液以 1:5 的比例稀释奶粉溶液

二、样品检测

1) 试剂使用前，应使其温度恢复至室温（ $25 \pm 2^\circ\text{C}$ ）

2) 吸取 100 μl 标准品（0, 20, 50, 100, 200 和 500 ppb）和准备好的样品加入相应的微孔中。然后，每孔再加入 50 μl 的三聚氰胺 HRP 酶标记物。

3) 利用 MK3 酶标仪的振荡功能，振板 60 秒，并在室温下孵育 30 分钟。

4) 孵育完后，将微孔板转移到 Wellwash 4MK2 洗板机上进行洗板，每孔加 250 μl 洗液，洗板四次。

5) 每孔加入 100 μl 显色底物溶液，避光孵育 20 分钟。

6) 每孔加入 100 μl 终止液，终止显色反应。

7) 在 MK3 酶标仪上读板，测量波长 450nm。

三、结果分析

1) 以浓度为 0 ppb 标准品的吸光值为基准 (B_0)，归一化标准品的检测吸光值 B/B_0 (B 指除 B_0 以外的标准品吸光值)。

2) 绘制以标准品的 B/B_0 为 Y 轴坐标、对应的标准品浓度为 X 轴坐标的散点图。

3) 对该散点图进行直线拟合。以该拟合曲线的直线方程对待测样品浓度进行计算。

4) 如果样品吸光值大于最小标样的吸光值，则该样品的浓度 < 20 ppb；如果样品吸光值小于最大标样的吸光值，则样品的浓度 > 500 ppb。

5) 结合稀释倍数，计算最终液态奶或奶粉中的三聚氰胺浓度，如液态奶稀释倍数是 10 倍。