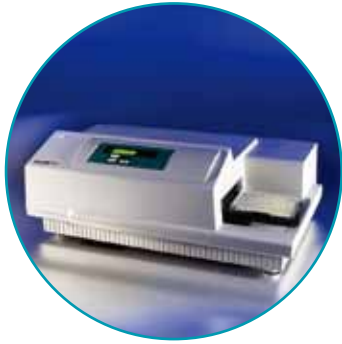


使用 Molecular Devices公司的SpectraMax光吸收型读板机及罗默实验室AgraQuant三聚氰胺检测试剂盒可快速检测不同样品中三聚氰胺的含量



SPECTRAMAX APPLICATION NOTE #13

By Cathy Olsen, Ph.D. and Evan G. Baxter,
Molecular Devices, Inc., 1311 Orleans Drive,
Sunnyvale, CA 94089.

简介:

有机碱三聚氰胺可用于生产很多产品，如塑料、阻燃材料、颜料和肥料等。最近有报道称某些厂家在动物饲料和人类的食品中添加三聚氰胺用于增加其中蛋白质的含量。由于三聚氰胺潜在毒性可引起人和动物的一系列疾病，甚至死亡。所以在各种食品中检测三聚氰胺含量方法越来越受到大家重视。在此篇应用文章中介绍并验证了两种来自于罗默实验室的三聚氰胺ELISA检测试剂盒：AgraQuant三聚氰胺检测试剂盒和AgraQuant灵敏型三聚氰胺检测试剂盒。

AgraQuant三聚氰胺检测试剂盒采用的原理为直接竞争酶联免疫吸附法(ELISA)，主要用于麦麸和宠物食品中的三聚氰胺含量的检测。AgraQuant灵敏型三聚氰胺检测试剂盒适合于对灵敏度要求更高的ELISA实验，如对牛奶、奶粉和其它日常消费品中三聚氰胺的检测。两种试剂盒，都是将待检测的样品和酶标记三聚氰胺加入预先包被有三聚氰胺抗体的微孔板中，待检测样品和标准品与酶标记三聚氰胺相互竞争的与微孔板中已包被的抗体结合。孵育一段时间后，使用缓冲液清洗微孔板，随后加入底物后再孵育一段时间后显色。在第二次孵育后，加入反应终止液来终止反应，在酶标仪中检测其在450nm波长下的吸光度值。颜色深度与混合物中样品及标准品中三聚氰胺的含量成反比。样品中三聚氰胺的含量可由标准曲线拟合后算出。

Molecular Devices光吸收型读板机检测三聚氰胺的吸光度值，针对三聚氰胺ELISA检测使用SoftMax® Pro GxP 软件中预先内置的模板进行数据的收集和分析，此软件是工业标准的分析软件，具有美国FDA21 CFR Part11认证。

材料:

- Molecular Devices具有吸收光检测模式的微孔板读板机，包括：
 - SpectraMax® Plus³⁸⁴ (Cat. #PLUS 384)
 - SpectraMax 190 (Cat. #190)
 - SpectraMax 340PC³⁸⁴ (Cat. #340PC 384)
 - VersaMax™ (Cat. #VERSAMAX)
 - VMax® (Cat. #VMAX)
 - EMax® (Cat. #EMAX)
 - SpectraMax M2/M2^e (Cat. # M2 or M2E)
 - SpectraMax M5/M5^e (Cat. #M5 or M5E)
 - FlexStation® 3 (Cat. #FLEX3)
- AgraQuant Melamine Test Kit (Romer Labs Cat. #COKAQ9300)
- AgraQuant Melamine Sensitive Test Kit (Romer Labs Cat. #COKAQ9400)

方法:

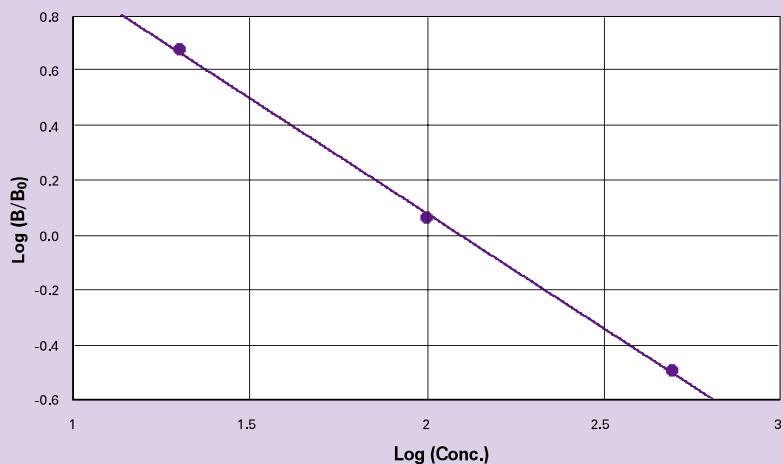
- 针对两个检测试剂盒，都遵循以下检测步骤：
- 使用以前先将试剂放在室温环境下一段时间后再使用。
 - 将检测板条放入板框适配器中，不使用的微孔板条放在具有干燥剂的塑料袋中。
 - 使用单道枪将150ul三聚氰胺标准品加入检测孔中，每次分装后均换枪头，三聚氰胺检测试剂盒包含0, 20, 100和500ppb标准品，灵敏型三聚氰胺检测试剂盒包含0, 20, 100和1000ppb标准品。
 - 使用8道排枪将50ul酶标记三聚氰胺分装入微孔板中。
 - 将微孔板均匀震荡60秒后在室温条件下孵育30分钟。
 - 将孔内的液体吸干后加入400ul去离子水后清洗4遍。

- 清洗后将微孔板倒扣在吸水纸表面，以便于去除残余洗液。
- 使用排枪将100ul底物溶液加入孔中。
- 将微孔板放在室温条件下孵育20分钟。
- 使用排枪将100ul终止反应液加入孔中。
- 使用VersaMax微孔板读板机，选择SoftMax Pro软件内预置的模板检测其在450nm波长下的光吸收值。
- SoftMax Pro软件中选择Semi-log曲线拟合方式。

结果:

各标品的OD值与零标准品OD值的比值 (B/B_0) 构建一条Semi-log方式拟合的浓度效应学曲线。根据拟合生成的标准曲线可计算出样品中三聚氰胺的浓度。如果样品中三聚氰胺的含量高于500ppb(常规试剂盒)或者1000ppb(灵敏型试剂盒)，样品需要进一步的进行稀释后重新分析以便获得精确的检测结果。如果样品中三聚氰胺的含量低于20ppb,结果中就会自动生成报告显示为“< (20 x dilution factor) ppb”^(1,2)。

图一：三聚氰胺检测试剂盒标准曲线

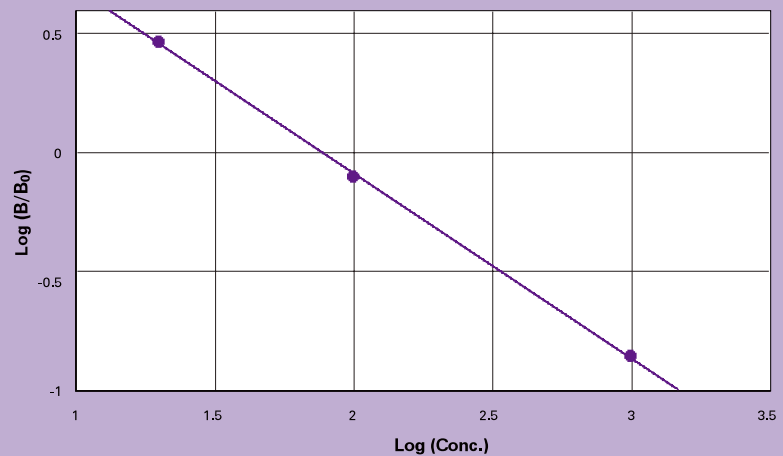


Linear Fit: $y = A + Bx$:

| | A | B | R ² |
|--|------|--------|----------------|
| ● Plot#1 (Standards: LogConc vs Logit) | 1.76 | -0.839 | 0.999 |

Melamine standards at 20, 100, and 500 ppb plotted as $\text{logit}(B/B_0)$ vs. $\text{log}(\text{concentration})$, $r^2 = 0.999$. 50% inhibition = 124.2 ppb.

图二：灵敏型三聚氰胺检测试剂盒标准曲线



Linear Fit: $y = A + Bx$:

| | A | B | R ² |
|--|------|--------|----------------|
| ● Plot#1 (Standards: LogConc vs Logit) | 1.47 | -0.778 | 0.999 |

Melamine standards at 20, 100, and 1000 ppb plotted as $\text{logit}(B/B_0)$ vs. $\text{log}(\text{concentration})$, $r^2 = 0.999$. 50% inhibition = 77.4 ppb.

图一为三聚氰胺检测试剂盒标准曲线logit (B/ B₀) vs. log(concentration), B为每个标准品的平均吸光度值, B₀为0ppb标准品的平均吸光度值。图二为灵敏型三聚氰胺检测试剂盒的标准曲线, 每条标准曲线的r²值均为0.999, 罗默实验室推荐的r²值应不低于0.985(常规试剂盒)和0.990(灵敏型试剂盒)。通过标准曲线计算出50%抑制率的浓度124.2ppb(常规试剂盒)和77.4ppb(灵敏型试剂盒); 两个数值与试剂盒说明书中给出的值相一致。

根据三聚氰胺检测试剂盒和灵敏型三聚氰胺检测试剂盒的要求得出重复性高的数据, 标准曲线的变异系数(CVs)<9%。这篇应用中所有标准曲线的CVs≤5%(见表一和表二)

表一：三聚氰胺检测试剂盒

| Standard (ppb) | Average OD | Std Dev | B/B ₀ , % | CV, % |
|----------------|------------|---------|----------------------|-------|
| 20 | 0.872 | 0.020 | 82.6 | 2.3 |
| 100 | 0.563 | 0.022 | 53.3 | 3.9 |
| 500 | 0.255 | 0.007 | 24.2 | 2.8 |

表二：灵敏型三聚氰胺检测试剂盒

| Standard (ppb) | Average OD | Std Dev | B/B ₀ , % | CV, % |
|----------------|------------|---------|----------------------|-------|
| 20 | 0.948 | 0.047 | 74.6 | 5.0 |
| 100 | 0.560 | 0.001 | 44.1 | 0.1 |
| 1000 | 0.155 | 0.001 | 12.2 | 0.8 |

通过SoftMax Pro软件计算出平均OD值, 标准偏差值, 平均B/B₀值和CVs值。实际检测后的变异系数(CVs≤5%)优于罗默实验室试剂盒说明书给出的值(CVs<9%)。

结论:

罗默公司的三聚氰胺检测试剂盒和灵敏型三聚氰胺检测试剂盒在结合Molecular Devices公司推出的SpectraMax, VersaMax, VMax, and EMax微孔板读板机, 可以针对各种奶制品(如鲜奶、奶粉、酸奶)和面粉及各种宠物食品中三聚氰胺的含量获得更加准确的检测结果。最后通过SoftMax Pro GxP软件获得全部数据的分析结果, 此款为工业标准分析软件并且符合FDA 21 CFR Part 11要求。

Molecular Devices公司的AquaMax® 4000微孔板洗板机连接其StakMax堆板机可以使得ELISA检测全自动化, 增加检测通量。用户也可以将StakMax®堆板机与Molecular Devices公司SpectraMax或VersaMax微孔板读板机连接。减少手动操作实现高通量的检测。

参考文献:

1. AgraQuant Melamine Test Kit product insert and Certificate of Performance.
2. AgraQuant Melamine Sensitive Test Kit product insert and Certificate of Performance.