

**Тест-система для определения меламина  
в пищевых продуктах  
методом иммуноферментного анализа  
«МУЛЬТИСКРИН® МЕЛАМИН»**

Иммуноферментный метод  
для количественного определения меламина в молоке  
(сыром, пастеризованном, стерилизованном,  
сухом восстановленном молоке и молочных продуктах)

Для тестирования In vitro  
Хранить при 2 - 8 °С



Официальный дистрибьютор  
R-Biopharm В Беларуси  
ОДО "КомПродСервис"

+375 (17) 336-50-54, +7 (499) 704-05-50

[www.komprod.com](http://www.komprod.com), [info@komprod.com](mailto:info@komprod.com)

## 1. Принцип работы теста

Принцип работы теста основан на непрямом конкурентном иммуноферментном анализе. Антиген (меламин, конъюгированный с белком) предварительно наносится на поверхность лунок иммунологических стрипов. Меламин в образце и антиген, локализованный на поверхности лунок, конкурируют за антитела против меламина. После добавления ферментного конъюгата, вносят раствор тетраметилбензидина (ТМВ) для окрашивания. Значение оптической плотности (ОП) тестируемого образца отрицательно коррелирует с концентрацией меламина в образце.

## 2. Технические характеристики

<b>Чувствительность:</b>	0.5 ppb
<b>Температура инкубации:</b>	25°C
<b>Время инкубации:</b>	30min~15min
<b>Порог определения:</b>	
Свежее молоко, жидкое молоко	5 ppb
Йогурт, сухое молоко	10 ppb
<b>Кросс-реактивность:</b>	
Меламин	100%
<b>Степень извлечения:</b>	
Свежее молоко, жидкое молоко	90±25%
Йогурт, сухое молоко	80±25%

## 3. Компоненты

1	Стрипы с микролунами		12 стрипов, каждый состоящих из 8 удаляемых лунок
2	6× стандартных растворов (по 1 мл каждый)	0 ppb 1.5 ppb 13.5 ppb 1.0 ppm	0.5 ppb 4.5 ppb 40.5 ppb
3	Ферментный конъюгат	7 мл	Красная крышка
4	Антитела, рабочий раствор	7 мл	Голубая крышка
5	Субстрат А	7 мл	Белая крышка
6	Субстрат В	7 мл	Черная крышка
7	Стоп раствор	7 мл	Желтая крышка
8	Моющий буфер, концентрат x 20	15 мл	Белая крышка
9	Раствор для экстракции, концентрат x20	50 мл	Прозрачная крышка
10	Раствор для разведения образца, концентрат x10	50 мл	Голубая крышка

## 4. Необходимые, но не предоставляемые материалы

- 1) Оборудование: микропланшетный ридер, принтер, вортекс, центрифуга, градуированные пипетки, весы (чувствительность 0,01 г).
- 2) Микродозаторы: одноканальные 20 ~ 200 мкл, 100 ~ 1000 мкл; многоканальные 30 ~ 300 мкл.

## **5. Предварительная обработка образца**

Инструкция. Следующие пункты необходимо учесть до проведения этапа предварительной обработки:

- 1) в эксперименте можно использовать только одноразовые наконечники, наконечники следует менять при использовании других реагентов;
- 2) перед экспериментом все оборудование должно быть чистым и, при необходимости, должно быть очищено повторно, чтобы избежать загрязнения, которое может повлиять на результаты эксперимента.

### **Приготовление растворов**

#### **А. Раствор для экстракции образцов**

Разведите 20х концентрат раствора для экстракции образцов деионизированной водой в соотношении 1:19.

#### **В. Разведение образца**

Разведите 10х концентрат раствора для разведения образца деионизированной водой в соотношении 1:9.

#### **5.1 Молоко (чистое молоко, свежее молоко)**

1. Отберите 50 мкл свежего молока для анализа

**Степень разведения образца: 1.**

#### **5.2 Сухое молоко**

1. Отберите 1 г сухого молока в 50 мл центрифужную пробирку, добавьте 9 мл раствора для экстракции образца, взболтайте на вортексе в течение 3 мин, центрифугируйте образец при 4000 об/мин при температуре 15 °С в течение 10 мин.
2. Отбросьте верхний жировой слой, отберите 50 мкл жидкого слоя молока для анализа.

**Степень разведения образца: 10.**

#### **5.3 Йогурт**

1. Отберите 1 г свежего йогурта в 10 мл/15 мл/50 мл центрифужную пробирку, добавьте 4,5 мл раствора для разведения образцов, взболтайте на вортексе в течение 1 мин, оставьте образец отстаиваться в течение 10 мин.
2. Отберите 50 мкл верхнего жидкого слоя для анализа.

**Степень разведения образца: 5.**

## **6. Этапы выполнения ИФА**

### **6.1 Инструкция**

1. Доведите температуру всех реагентов и иммунологических стрипов до комнатной (20-25 °С).
2. Сразу после использования верните все реагенты в температуру 2-8 °С.

3. Воспроизводимость результатов ИФА, в значительной степени, зависит от качества процедур промывки. Правильная процедура промывки является ключевым моментом в проведении ИФА.

4. Избегайте при проведении инкубации в условиях постоянной температуры воздействия света на все образцы и реагенты, микропланшет должен быть закрыт пленкой.

## **6.2 Операционные процедуры**

1. Перед использованием необходимо выдержать компоненты набора при комнатной температуре (20-25 °С) в течение не менее 30 мин, перед использованием аккуратно встряхните каждый реагент. Поместите необходимое количество микролуночных стрипов в рамку планшета. Запечатайте неиспользованные стрипы и храните их при 2-8 °С, не замораживайте.

2. Приготовление рабочего промывочного раствора: разведите 15 мл 20х концентрированного промывочного буфера деионизированной водой до 300 мл.

3. Каждый образец и стандартный раствор должны быть исследован в повторях; запишите, как расположены лунки с образцами и стандартными растворами.

4. Внесите по 50 мкл образца (или стандартного раствора) в две отдельные лунки, затем добавьте 50 мкл ферментного конъюгата, далее добавьте 50 мкл рабочего раствора антител в каждую лунку, аккуратно круговым движением встряхните стрипы, закройте микропланшет пленкой и инкубируйте **при 25 °С в течение 30 мин.**

5. Вылейте жидкость из лунок, промойте микропланшет разбавленным промывочным буфером, заливая в каждую лунку по 250 мкл буфера в течение 5-6 раз. Каждый раз оставляйте промывочный буфер на 15-30 секунд в лунке. Для удаления жидкости из лунок планшет необходимо перевернуть и энергично постучать рамку с лунками по столу, накрытому листом сухой фильтровальной бумаги, если в лунках останутся пузырьки удалите их сухим чистым участком бумаги.

6. Окрашивание: добавьте 50 мкл субстрата А, затем 50 мкл субстрата В в каждую лунку. Аккуратно перемешайте, встряхивая планшет круговыми движениями. Инкубируйте планшет **при 25 °С в течение 15 минут** в темноте для развития окраски.

7. Учет результатов: добавьте 50 мкл стоп-раствора в каждую лунку. Аккуратно перемешайте планшет. Установите на ридере микропланшетов длину волны 450 нм, чтобы определить значение оптической плотности каждой лунки. В качестве референс волны можно использовать длину волны 630 нм. Рекомендуется регистрировать значение оптической плотности образца на длине волны 450/630 нм в не позднее 5 минут после остановки реакции.

## 7. Оценка результатов

Есть два способа оценить результаты измерений: первый – это качественная оценка, а второй – количественная оценка. Обратите внимание, что значение ОП образца отрицательно коррелирует с содержанием меламина.

### 7.1 Качественная оценка

Диапазон концентраций (нг/мл) в пределах которых находится меламина в образце может быть получен путем сравнения среднего значения ОП тестируемого образца со значением ОП стандартного раствора. Предположим, что значение ОП образца I равно 0.3, а значения образца II равно 1.0, значение ОП стандартных растворов составляет: 2.043 для 0 ppb, 1.554 для 0.5 ppb, 1.015 для 1.5 ppb, 0.474 для 4.5 ppb, 0.151 для 13.5 ppb, 0.055 для 40.5 ppb, соответственно, диапазон концентраций меламина в образце I составляет от 4.5 до 13.5 ppb, а диапазон концентраций меламина в образце II – от 1.5 до 4.5 ppb.

### 7.2 Количественная оценка

Значения ОП для стандартных растворов и проб (среднее значение двух параллельных измерений) делят на среднее значение ОП нулевого стандартного раствора и умножают на 100. Таким образом, нулевой стандартный раствор принимается за 100% (максимальная оптическая плотность) и другие значения ОП приводятся в процентах от максимальной ОП.

$$\frac{B}{B_0} \times 100\% = \% \text{ от максимальной ОП}$$

B – среднее (двойные лунки) значение ОП тестируемого образца или стандартного раствора,

B<sub>0</sub> – среднее значение ОП стандартного раствора 0 нг/мл.

Нарисуйте стандартную кривую с процентами поглощения стандартных растворов и полулогарифмическими значениями концентраций меламина в стандартных растворах (нг/мл) в качестве значений осей Y и X соответственно. Рассчитайте соответствующую концентрацию меламина в тестируемом образце из стандартной кривой, соотнесите, на стандартной кривой, процент поглощения образца и соответствующую концентрацию меламина. Полученное значение концентрации умножьте на соответствующую кратность разведения, и в итоге получите реальную концентрацию меламина в образце.

## 8. Меры предосторожности

1. Комнатная температура ниже 25 °C или использование реагентов и тестовых образцов не прогретых до 20-25 °C приведет к снижению значений ОП.

2. Не допускайте высыхания лунок перед внесением следующего реагента это может привести к нарушению линейности стандартной кривой и нарушению воспроизводимости, поэтому переходите к следующему этапу анализа сразу после промывки.

3. Смешайте реагенты равномерно, в противном случае будет нежелательная воспроизводимость.
4. Стоп-раствор – это 2 М раствор серной кислоты, избегайте контакта раствора с кожей.
5. Не используйте набор с истекшим сроком годности. Использование разбавленных или фальсифицированных реагентов из наборов приведет к изменению чувствительности и искажению значений ОП. Не используйте компоненты из разных партий.
6. Поместите неиспользованные стрипы в пакет, запечатайте его. Стандарты и окрашивающий реагент чувствительны к свету, поэтому не подвергайте их прямому воздействию света.
7. Окрашивающий раствор должен быть бесцветным, при появлении любого окрашивания раствор считается непригодным к использованию. Оптическая плотность нулевого стандартного раствора (0 ppb) менее 0,5 указывает на его деградацию.
8. Оптимальная температура реакции составляет 25 °С, а слишком высокая или слишком низкая температура приведет к изменениям чувствительности обнаружения и изменению значений оптической плотности.

#### **9. Хранение и срок годности**

Хранение: хранить при 2-8 °С, не замораживать.

Срок годности: 12 месяцев с даты изготовления; дата изготовления указана на коробке

**Примечание.** Если вакуумная упаковка микропланшета повреждена, микропланшет по-прежнему можно использовать, без опасения за результат теста.



Техническая поддержка и прием заявок:  
+375 (17) 336-50-54, +7 (499) 704-05-50, +7 (499) 649-02-01  
[info@komprod.com](mailto:info@komprod.com), [support@komprod.com](mailto:support@komprod.com), [info@neo-test.ru](mailto:info@neo-test.ru)