

本公司提供的电子版说明书仅供参考，实验请以收到的纸质手册为准。

TK01756 /96空板

Enzyme immunoassay (ELISA) technique.

For Vitamin D (25OH) (Free)

物种: Human

第三版

## [ 产品简介 ]

本试剂盒采用夹心法原理。将特异性抗Human Vitamin D (25OH) (Free) 抗体包被于 96 孔微孔板中，向微孔中分别加入Human Vitamin D (25OH) (Free) 标准品和标本，使标准品中的Human Vitamin D (25OH) (Free) 蛋白及标本中的Human Vitamin D (25OH) (Free) 蛋白与固相于微孔板上的抗Human Vitamin D (25OH) (Free) 抗体结合，然后加入辣根过氧化物酶标记抗Human Vitamin D (25OH) (Free) 抗体，将未结合的辣根过氧化物酶标记抗Human Vitamin D (25OH) (Free) 抗体洗净后，加入 TMB 底物显色。TMB在过氧化物酶的催化下转化成蓝色，并在酸的作用下转化成最终的黄色。颜色的深浅和样品中的Human Vitamin D (25OH) (Free) 蛋白呈正相关。用酶标仪在 450nm 波长下测定吸光度(O.D.值)，计算样品浓度。

## [ 试剂盒组分 ]

组分	数量	组分	数量
Pre-coated, ready to use 96-well strip plate	1	Plate sealer for 96 wells	4
Standard	2	Standard Diluent	1 × 20mL
Detection Reagent A	1 × 120 μ L	Assay Diluent A	1 × 12mL
Detection Reagent B	1 × 120 μ L	Assay Diluent B	1 × 12mL
TMB Substrate	1 × 9mL	Stop Solution	1 × 6mL
Wash Buffer (30 × concentrate)	1 × 20mL	说明书	1

## [ 需要准备的相关试剂及设备 ]

1. 可检测 450nm 吸光度的酶标仪.
2. 单道及多道移液器.
3. 恒温箱.
4. D洗板机 ( 可选 ).
5. 混匀器.
6. 灭菌的 EP 管.
7. 蒸馏水或去离子水.
8. 配置洗液或相关工作液用的灭菌玻璃容器.

## [ 样本收集准备及保存 ]

本试剂盒可检测人血清、血浆、尿液及相关体液。具体标本处理方法如下：

1. 血清：将收集于血清分离管的全血标本在室温放置 2 小时或 4 过夜，然后 1000 × g 离心 20 分钟，取上清即可，或将上清置于 -20 或 -80 保存，但应避免反复冻融。

1. 血浆：用枸橼酸盐或肝素作为抗凝剂采集标本，并将标本在采集后的 30 分钟内于 2-8 1000 × g 离心 15 分钟，取上清即可检测，或将上清置于 -20 或 -80 保存，但应避免反复冻融。
3. 尿液：用无菌管收集 1000 × g 离心 20 分钟，取上清即可检测。
4. 其它生物标本：请 1000 × g 离心 20 分钟，取上清即可检测，或将上清置于 -20 或 -80 保存，但应避免反复冻融。

**注意：**

1. 以上标本均需密封保存，4 保存应小于 1 周，-20 保存小于 6 个月。
2. 标本溶血会影响最后检测结果，因此溶血标本不宜进行此项检测。
3. 标本使用前应缓慢平衡至室温，不应加热使之溶解。

## [ 相关试剂准备 ]

部分试剂需您配置成工作液后再使用。

1. 所有试剂在启用前请于室温平衡 30 分钟，室温请控制在 25 左右。酶标板平衡请不要拆掉封口袋。
2. Vitamin D (25OH) (Free) Standard：Vitamin D (25OH) (Free) 标准品为冻干粉。每支标准品加入 Vitamin D (25OH) (Free) 标准品稀释液 1.0mL，即为 10ng/mL。盖好后室温静置 3 分钟，使用混匀器混匀或颠倒混匀。此后进行倍比稀释成 10ng/mL，5ng/mL，2.5ng/mL，1.25ng/mL，0.625ng/mL，0.312ng/mL，0.156ng/mL，标准品稀释液(0ng/mL)为空白孔。根据您的量配置好标准品待用。配置好的标准品建议在 15 分钟内加样，不建议放置过长时间。
3. Vitamin D (25OH) (Free) Conjugate：Vitamin D (25OH) (Free) 标记抗体为 100x 高浓度试剂。使用前用 Vitamin D (25OH) (Free) 标记抗体稀释液 将其稀释 100 倍。根据需要的量配置好工作液待用。配置好的工作液建议在 15 分钟内加样，不建议放置过长时间。
4. SA-HRP：链亲和素-HRP 为 100x 高浓度试剂。使用前用链亲和素-HRP 稀释液将其稀释 100 倍。根据您的量配置好工作液待用。配置好的工作液建议在 15 分钟内加样，不建议放置过长时间。
5. Wash Buffer：洗液为 30x 高浓度试剂。使用前用蒸馏水或去离子水将其稀释 30 倍。

**注意：**

1. 为了保证实验时间的准确性，建议您提前 10 分钟配置好您要使用的试剂。
2. 溶解使用过的标准品溶液不建议过夜使用，部分蛋白的活性可能因此损失。
3. 配置好的工作液不建议过夜使用，标记抗体及酶活性可能因此损失。
4. 高浓度的试剂使用前可进行离心，再根据您的实验要求吸取一定量配置成工作液。
5. 实验中请使用本试剂盒提供的洗液，请勿使用其他厂家的洗液，否则可能造成实验结果不理想。
6. TMB Substrate 使用中避免污染；避免接触金属制品，以免引起试剂失效。
7. Stop Solution 溶液有弱腐蚀性，避免飞溅引起损伤。
8. 需要稀释配置成工作液的试剂，请在配置好后注意充分混匀，否则可能造成实验结果不理想。
9. 需要稀释配置成工作液的试剂，请使用无菌容器进行配置，否则可能造成实验结果不理想。
10. 实验过程中建议佩戴口罩，以免由于唾液飞溅对检测结果造成干扰（唾液中含有大量酶等物质）。

## [ 样本预处理 ]

1. 血清：建议样本原液-10 倍稀释后检测。
2. 血浆：建议样本原液-10 倍稀释后检测。

3. 尿液：建议样本原液检测。
4. 其它生物标本：请根据您的标本的预计含量选择合适的稀释倍数。

**注意：**

1. 如您要测试的样本数量较多可使用 0.01M PBS 代替本试剂盒中的标准品稀释液对标本进行稀释。
2. 由于生物机体处于不同状态下蛋白的表达量不一，以上建议的样本稀释液倍数为正常分布状态。建议可在正式实验前做预实验确定稀释倍数，以免损失您的样本。
3. 样本使用前均应进行离心处理，以保证检测结果的重复性。
4. 由于不同蛋白在不同保存情况下的稳定性均不相同，您在开始实验前应注意样本的保存形式、缓冲液体系、以及保存的温度。

**[ 实验步骤 ]**

1. 试剂平衡：将需要使用的相关试剂，如：预包被微孔板、标准品、标准品稀释液、待检测的样本，在实验开始前于室温平衡 30 分钟。
2. 取出酶标板：根据实验需要，取出相应的预包被条。剩余部分，放回封袋中于-20 保存。
3. 加样：标准品加样，依次加入 100ul 不同浓度的标准品。空白孔加 100ul 标准品稀释液，余孔加待测样品 100ul 每孔，酶标板加上覆膜，37 温育 2 小时。推荐测试 2 条平行的标准曲线，计算时取平均值。
4. 加标记抗体工作液：弃去液体，甩干，不用洗涤。每孔加标记抗体工作液(可提前 15 分钟配制)100ul 每孔，酶标板加上覆膜，37 温育 1 小时。
5. 洗板，弃去孔内液体：洗板 3 次。每孔用 350ul 的洗涤液洗涤，浸泡 1-2 分钟，甩掉酶标板内的液体(或用洗板机进行洗板)。最后一次洗涤完成后，在吸水纸上将酶标板拍干。
6. 加链亲和素-HRP 工作液：酶标板拍干后，立即每孔加链亲和素-HRP 工作液(可提前 15 分钟配制)100ul 每孔，加上覆膜，37 温育 30 分钟。
7. 洗板,加 TMB 底物溶液：弃去孔内液体，甩干，洗板 5 次，方法同步骤 5。立即每孔加 TMB 底物溶液 90ul，酶标板加上覆膜，37 避光显色(反应时间控制在 15-25 分钟，不要超过 30 分钟。当显色反应有明显的梯度蓝色，即加入终止液终止反应)。
8. 加终止液,读数：每孔加终止液 50ul，终止反应，此时蓝色立转黄色。轻轻晃动酶标板使终止反应充分进行。轻拭酶标板底部，立即使用酶标仪在 450nm 波长测量各孔的光密度(OD 值)。推荐使用双波长进行检测：450nm，630nm。

**[ 结果计算 ]**

将标准品、空白孔、样本 OD 值取其平均值计算。以标准品的浓度为纵坐标(或对数坐标)，OD 值为横坐标(或对数坐标)，绘出标准曲线。推荐使用曲线专家软件进行分析。根据标准物的浓度与 OD 值计算出标准曲线的回归方程式，将样品的 OD 值代入方程式，计算出样品浓度，再乘以稀释倍数，即为样品的实际浓度。

**[ 检测范围 ]**

0 - 40 pg/mL..

**[ 灵敏度 ]**

用标准品稀释液做为样本进行检测，重复测定 20 次，得出 20 次测量结果的吸光度值，计算其平均值 (M) 和标

准差 (SD)，得出  $M+2SD$  对应的值为本试剂盒的检测灵敏度。经测试本试剂盒的灵敏度为  $1.9 \text{ pg/mL}$ 。

## [ 特异性 ]

本试剂盒用于特异性检测人天然或重组 Vitamin D (25OH) (Free)，经检测与其它相似物质无明显交叉反应。

## [ 精密度 ]

用同一份质控样品，在一个批次的产品内重复检测 10 次，计算变异系数 (CV)。测试  $CV < 10\%$

用 3 个批次的产品检测同一份样本，计算 3 个批次的产品之间的变异系数 (CV)。测试  $CV < 12\%$ 。

批内差:  $CV < 10\%$

批间差:  $CV < 12\%$

## [ 重复性 ]

用高中低 3 个浓度的质控样品，在一个批次的产品内分别重复检测 10 次，计算变异系数 (CV)。测试  $CV < 11\%$ 。

## [ 稳定性 ]

根据相关行业标准，对试剂盒进行热稳定性测试。在  $37^\circ\text{C}$ ，破坏 3 天后，对试剂盒的检测灵敏度、特异性、重复性进行复检，计算各项参数均符合要求。

## [ 有效期 ]

本试剂盒有效期为六个月。

## [ 相关注意事项 ]

1. 本产品中 Stop Solution 为稀硫酸，有轻微的腐蚀性，请注意做好相应的防护。
2. 请使用本产品时注意试剂不要混用其他批次或者其他厂家的，否则结果可能与预期存在差异。
3. 收到产品后，请务必按照说明书的要求存放试剂。
4. 请在实验开始前，确定已准备好需要的实验用具及相关仪器，以免给实验造成不必要的困扰。
5. 本产品在生产后均进行了相关的检测，如对实验结果有疑问，请联系我们。