

仅供科研使用，不得用于临床诊断

猪 25 羟基维生素 D3（25 HVD3）定量检测试剂盒（ELISA）

定量检测血清、血浆、细胞培养上清液、组织中猪 25 羟基维生素 D3（25 HVD3）的含量。

使用试剂盒前，必须仔细阅读本说明书。

实验原理

试剂盒采用酶联免疫分析方法。采用生物素标记 25 羟基维生素 D3 (25 HVD3), 纯化的抗 25 羟基维生素 D3 (25HVD3) 抗体包被微孔板, 在竞争抑制反应中, 一定量的固相抗体与生物素标记 25 羟基维生素 D3 (25 HVD3) 及非标记抗原 (校准品或标本) 进行抑制竞争反应, 抗体与生物素标记的 25 羟基维生素 D3 (25 HVD3) 结合量受非标记抗原量所抑制, 非标记抗原量多, 抗体与生物素标记的 25 羟基维生素 D3 (25HVD3) 结合就少, 反之结合就多; 反应平衡后, 形成固相抗体-生物素化 Syndecan-4, 再加入酶标记的亲合素, 形成固相抗体-生物素化 25 羟基维生素 D3 (25HVD3)-酶标-亲合素复合物。经加底物显色后, 用酶标仪在 450nm 波长下测定吸光度 (OD 值)。随着 25 羟基维生素 D3 (25 HVD3) 浓度的升高, OD 值逐渐下降呈良好的线性关系。本试剂盒具有灵敏度高、特异性强、重复性好、操作简单、快速等特点, 对血清中 25 羟基维生素 D3 (25 HVD3) 的减少或升高有可靠的检出性能。

试剂盒限制性

- 1、仅供科研使用, 不得用于临床诊断。
- 2、在试剂盒标示的有效期内使用, 过期产品不得使用。
- 3、跟其他厂家的试剂盒或者组分不能混用。
- 4、样品需要稀释的话可以用 PBS (PH7.4) 稀释。
- 5、如果样本值高于最高标准品浓度值, 请将样本适当稀释后, 再重新测定。
- 6、待测样本中可能存在的异嗜抗体会干扰检测结果, 检测前, 请排出该因素。
- 7、通过其他方法得到的检测结果, 与本试剂盒测定结果不具有直接的可比性。

技术提示

- 1、混合蛋白溶液时, 避免起泡。
- 2、加校准品与样本时, 每个校准品浓度和样本都要更换移液枪头, 公共组分应该悬臂加样, 避免交叉污染。
- 3、合适的温育时间, 和充分的洗涤步骤, 是保证实验结果准确性的必要条件。
- 4、使用自动洗板机时, 加入一个 30 秒浸泡的步骤, 可以提高检测精度。
- 5、底物溶液为无色液体, 保存过程中变为蓝色, 代表底物溶液已经失效, 不得使用。
- 6、终止液加样顺序与底物溶液加样顺序一致, 加入终止液后, 蓝色底物产物, 会瞬间变为黄色。
- 7、实验中, 用剩的板条, 应立即放回自封袋中, 密封 (低温干燥) 保存。

仅供科研使用, 不得用于临床诊断。

8、所有液体组分，使用前充分摇匀，严格按照说明书标明的时间、加样量及加样顺序进行温育操作。

试剂盒组分与保存

未开封的试剂盒保存在 2-8 度，不得使用过期试剂盒。

组分	数量	主要成分
校准品	0.5ml/管*6 管	抗原配制的 6 个浓度标准品
包被微孔板	96T/48T	预包被固相抗体
HRP 标记抗体	6mL	HRP 标记的检测抗体
生物素化抗原	6mL	检测抗原
底物液 A	6mL	过氧化脲工作液
底物液 B	6mL	TMB 工作液
终止液	6mL	2mol/L 稀释液
样本稀释液	6mL	PBS
20×浓缩洗涤液	30mL	含 0.15%Tween20 的 PBS
说明书	1 份	--
自封袋	1 个	--
不干胶	2 片	--

校准品浓度依次为：80、40、20、10、5、0 μ g/L。

本品必须按照具有潜在的感染性进行处理，处理过程应当遵循通用的安全措施。

其他用品

- 1、酶标仪（450nm）
- 2、精密移液器及一次性吸头
- 3、蒸馏水
- 4、洗瓶或者自动洗板机
- 5、37℃水浴锅或恒温箱
- 6、500ml 量筒

生物安全

仅供科研使用，不得用于临床诊断。

- 1、检测必须符合实验室管理规范的规定，严格防止交叉污染，所有样品、洗弃液和各种废弃物都应按照传染物进行处置。
- 2、试剂盒的液体组分中，含有 proclin-300 防腐剂，可能引起皮肤过敏反应，避免吸入烟雾与皮肤接触。
- 3、底物液对皮肤、眼睛和上呼吸道有刺激作用，避免吸入烟雾。
- 4、戴上防护手套，实验完成后彻底洗手。

样品的采集和储存

样本类型和采集

以下只是列出样品采集的一般指南。所有样本采集过程中，不得使用叠氮钠做为防腐剂。

1、细胞培养上清：4000rpm 条件下离心 20min，去除细胞颗粒和聚合物，上清液保存在-20℃以下，避免反复冻融。

2、血清：使用不含热原和内毒素的试管，操作过程中避免任何细胞刺激，4000rpm 条件下离心 20min，小心地分离出血清，保存在-20℃以下，避免反复冻融。

3、血浆：肝素，EDTA，或柠檬酸钠作为抗凝剂。在 4000rpm 条件下，离心 20 分钟取上清，血浆保存在-20℃以下，避免反复冻融。

4、组织：用预冷的 PBS (0.01 M, pH=7.4) 冲洗组织，去除残留血液，称重后将组织剪碎。将剪碎的组织与对应体积的 PBS (一般按 1: 9 的重量体积比，比如 1g 的组织样品对应 9 mL 的 PBS，具体体积可根据实验需要适当调整，并做好记录。推荐在 PBS 中加入蛋白酶抑制剂) 加入玻璃匀浆器中，在冰上充分研磨。为了进一步裂解组织细胞，可以对匀浆液进行超声破碎或反复冻融。最后将匀浆液 5000×g 离心 5-10 分钟，取上清检测。

样本保存和稳定性

样本在 2-8℃ 条件下，可以储存 72h，或者在-20℃ 储存 6 个月。样本收集后，不是一次检测完，请按一次用量分装冻存，避免反复冻融，使用时在室温下解冻，确保样品均匀充分解冻。

检验方法

操作程序

1. 将各种试剂移至室温平衡两小时，取浓缩洗涤液，根据当批检测数量，用蒸馏水 1: 20 稀释，混匀后备用。

仅供科研使用，不得用于临床诊断。

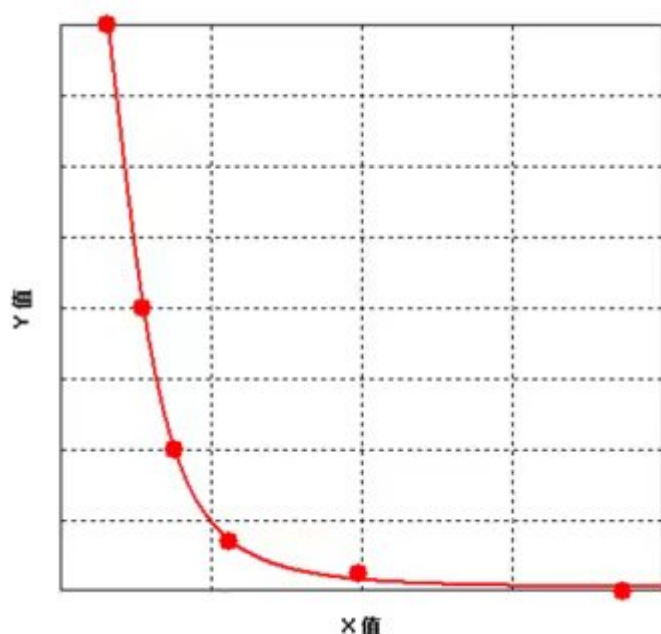
2. 将预包被板从密封袋中取出，设一个空白对照孔，不加任何液体；每个校准品设 2 孔，每孔加入对应校准品 50 μ l；其余每个检测孔直接加待测血清或质控品 50 μ l。
3. 除空白孔外所有孔加入生物素化抗原 50 μ l，混匀，贴上封板膜，置 37 $^{\circ}$ C 温育 60 分钟。
4. 手工洗板：弃去孔内液体，洗涤液注满各孔，静置 10 秒甩干，重复 3 次后拍干。洗板机洗板：选择洗涤 3 次程序洗板后拍干。
5. 每孔加入酶标亲合素 50 μ l（空白对照孔除外），混匀，贴上封板膜，置 37 $^{\circ}$ C 温育 30 分钟。
6. 手工洗板：弃去孔内液体，洗涤液注满各孔，静置 10 秒甩干，重复 3 次后拍干。洗板机洗板：选择洗涤 3 次程序洗板后拍干。
7. 每孔加显色剂 A 50 μ l，显色剂 B 50 μ l，振荡混匀后，置 37 $^{\circ}$ C 避光显色 15 分钟，每孔加终止液 50 μ l。

用酶标仪读数，取波长 450nm，先用空白对照孔调零点，然后测定各孔光密度值（OD 值）。

结果计算

检测完成后，以标准品浓度做为纵坐标，对应的吸光度（OD 值）作为横坐标，利用计算机软件，采用四参数 Logistic 曲线拟合（4-p1），创建标准曲线方程，通过样品的吸光度（OD 值），利用方程计算样品的浓度值。

如果样品被稀释，通过上述方法测得的浓度值，要乘以稀释倍数，才是样品的最终浓度。



(示意图，仅供参考)

试剂盒性能指标

仅供科研使用，不得用于临床诊断。

1、物理性能

外观和物理检查：液体组分应澄清，无沉淀或絮状物；所有组分应无包装破损。各组分装量不少于组分表中要求。

2、剂量反应曲线线性

用四参数 Logistic 曲线拟合（4-pl），剂量-反应曲线相关系数（r）的绝对值应不低于 0.9900。

3、精密度

批内精密度：三组已知的高、中、低浓度样品，进行二十次在同一个板块内精度评估。批内变异系数 CV% 小于 15%。

批间精密度：三组已知的高、中、低浓度样品，进行二十次在不同板块内精度评估。批间变异系数 CV% 小于 15%。

4、灵敏度

最低检出限：应不高于 $0.1 \mu\text{g/L}$ 。

5、回收率

三组已知的高、中、低浓度样品，进行五次在同一个板块内回收率评估，回收率在 85%-115% 之间。

6、稳定性

2°C - 8°C 保存，有效期 6 个月。

7、检测范围

$5 \mu\text{g/L}$ - $80 \mu\text{g/L}$

仅供科研使用，不得用于临床诊断。