

小鼠25羟基维生素D3 (25(OH)D3) 定量检测试剂盒 (ELISA)

实验原理:

本试剂盒采用竞争ELISA法, 往预先包被25羟基维生素D3 (25(OH)D3) 抗体的微孔板中依次加入样本/校准品和生物素抗原, 经过温育洗涤, 再加入SA-HRP温育。再次洗涤后加入底物TMB显色, 室温显色并用终止液终止反应后读取OD值。OD值高低和样品中的25羟基维生素D3 (25(OH)D3) 呈负相关。

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(OH)D3) 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。
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
SA-HRP	12mL	HRP标记
生物素抗原	12mL	抗原
TMB	12mL	TMB工作液
终止液	12mL	2mol/L稀释液
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: 48、24、12、6、3、0ng/mL。



扫一扫 加微信

上海尚宝生物科技有限公司

Shanghai Saint-Bio Biotechnology Co.,Ltd

地址: 上海市徐汇区龙华路2518弄14号

电话: 400-611-0007 13671551480

Q Q: 807961520

邮箱: saintbio@126.com

http://www.saint-bio.com

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°C水浴锅或恒温箱
6. 500ml量筒

生物安全：

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病物进行处置。
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°C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°C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°C以下，避免反复冻融。
4. 组织：用预冷的PBS (0.01M, 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9mL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°C条件下，可以储存72h，或者在-20°C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。
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15μl；其余每个检测孔直接加待测血清或质控品15μl。
3. 除空白孔外所有孔加入Asaay Diluent 100μl，混匀，贴上封板膜，置室温（20-25°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SA-HRP 100μl（空白对照孔除外），混匀，贴上封板膜，置室温（20-25°C）温育30分钟。



扫一扫 加微信

上海尚宝生物科技有限公司

Shanghai Saint-Bio Biotechnology Co.,Ltd

地址：上海市徐汇区龙华路2518弄14号

电话：400-611-0007 13671551480

Q Q：807961520

邮箱：saintbio@126.com

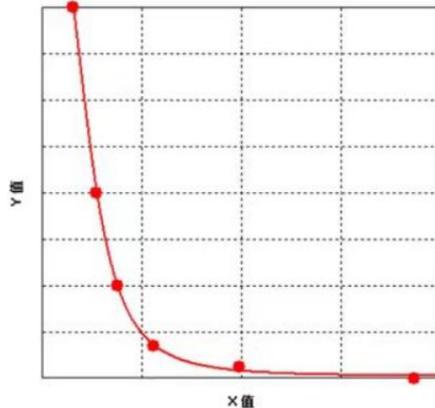
<http://www.saint-bio.com>

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TMB 100 μ l，振荡混匀后，置室温（20-25 $^{\circ}$ C）避光显色15分钟，每孔加终止液100 μ l。
8. 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，以标准品浓度做为横坐标，对应的吸光度（OD值）作为纵坐标，利用计算机软件，采用四参数Logistic曲线拟合（4-pl），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：

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0.1ng/mL。

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

2-8 $^{\circ}$ C保存，有效期6个月。

7. 检测范围

3ng/mL – 48ng/mL



扫一扫 加微信

上海尚宝生物科技有限公司

Shanghai Saint-Bio Biotechnology Co.,Ltd

地址：上海市徐汇区龙华路2518弄14号

电话：400-611-0007 13671551480

Q Q：807961520

邮箱：saintbio@126.com

<http://www.saint-bio.com>