

## 小鼠维生素 D(VD)ELISA 试剂盒

本试剂盒仅供科研使用

- 1、查看 ELISA 实验常见问题请登录: [http://www.yfxbio.com/article.asp?m\\_id=122](http://www.yfxbio.com/article.asp?m_id=122)
- 2、参考翼飞雪 ELISA 试剂盒引用文献请登录: [http://www.yfxbio.com/article.asp?m\\_id=138](http://www.yfxbio.com/article.asp?m_id=138)

**试剂盒编号:** YFXEM00346

**试剂盒适用:** 小鼠血液、组织、细胞上清、体液等标本中维生素 D(VD)的含量。

### 一、试剂盒组成

试剂盒成分	96 孔	48 孔	储存温度
说明书	1 份	1 份	
封板膜	2 片 (48)	2 片 (96)	
密封袋	1 个	1 个	
微孔酶标板	12 孔 × 8 条	12 孔 × 4 条	2-8℃
标准品	0.3mL*6 管	0.3mL*6 管	2-8℃
<b>注:</b> 标准品 (S0-S5) 浓度依次为: 0ng/mL、3ng/mL、6ng/mL、12ng/mL、24ng/mL、48ng/mL。			
样本稀释液	6mL	3mL	2-8℃
检测抗体-HRP	10mL	5mL	2-8℃
20 × 洗涤缓冲液	25mL	15mL	2-8℃
<b>注:</b> 20 × 洗涤缓冲液使用前用蒸馏水按 1: 20 的比例稀释, 即 1 份的 20 × 洗涤缓冲液加 19 份的蒸馏水。			
底物 A	6mL	3mL	2-8℃
底物 B	6mL	3mL	2-8℃
终止液	6mL	3mL	2-8℃

### 二、实验原理

本试剂盒采用竞争法酶联免疫吸附试验 (ELISA)。往预先包被维生素 D (VD) 抗体的包被微孔中, 依次加入标本、标准品、HRP 标记的竞争抗原, 经过温育并彻底洗涤。用底物 TMB 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维生素 D (VD) 呈负相关。用酶标仪在 450nm 波长下测定吸光度 (OD 值), 计算样品浓度。

### 三、自备试剂耗材

酶标仪 (450nm), 高精度加样器及枪头: 0.5-10 $\mu$ L、2-20 $\mu$ L、20-200 $\mu$ L、200-1000 $\mu$ L, 37℃ 恒温箱。

### 四、样本处理要求

- 1、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, 收集血液后, 3000 转离心 10 分钟将血清和红细胞迅速小心地分离。
- 2、血浆: 应根据标本的要求选择 EDTA 或柠檬酸钠作为抗凝剂, 混合 10-20 分钟后, 离心 20 分钟左右 (2000-3000 转/分)。仔细收集上清, 保存过程中如有沉淀形成, 应再次离心。
- 3、尿液: 用无菌管收集, 离心 20 分钟左右 (2000-3000 转/分)。仔细收集上清, 保存过程

- 中如有沉淀形成, 应再次离心。胸腹水、脑脊液参照实行。
- 4、细胞: 检测分泌性的成份时, 用无菌管收集, 离心 20 分钟左右 (2000-3000 转/分)。仔细收集上清。检测细胞内的成份时, 用 PBS (PH7.2-7.4) 稀释细胞悬液, 细胞浓度达到 100 万/mL 左右。通过反复冻融, 以使细胞破坏并放出细胞内成份。离心 20 分钟左右 (2000-3000 转/分)。仔细收集上清。保存过程中如有沉淀形成, 应再次离心。
  - 5、组织标本: 切割标本后, 称取重量。加入一定量的 PBS, PH7.4 (建议组织重量与 PBS 体积比例为 1:9, 即 1g 组织, 加入 9mL PBS)。用液氮迅速冷冻保存备用。标本融化后仍然保持 2-8℃ 的温度。加入一定量的 PBS (PH7.4), 用手工或匀浆器将标本匀浆充分。离心 20 分钟左右 (2000-3000 转/分)。仔细收集上清。分装后一份待检测, 其余冷冻备用。
  - 6、标本采集后尽早进行提取, 提取按相关文献进行, 提取后应尽快进行实验。若不能马上进行试验, 可将标本放于 -20℃ 保存, 但应避免反复冻融。
  - 7、不能检测含 NaN<sub>3</sub> 的样品, 因 NaN<sub>3</sub> 抑制辣根过氧化物酶的 (HRP) 活性。

## 五、洗板方法

- 1、手工洗板: 甩尽孔内液体, 每孔加满洗涤液, 静置 1min 后甩尽孔内液体, 在吸水纸上拍干, 如此洗板 5 次。
- 2、自动洗板机: 每孔注入洗液 350μL, 浸泡 1min, 洗板 5 次。

## 六、操作步骤

- 1、从室温平衡 20min 后的铝箔袋中取出所需板条, 剩余板条用自封袋密封放回 4℃。
- 2、设置标准品孔和样本孔, 标准品孔各加不同浓度的标准品 50μL。
- 3、样本孔先加待测样本 10μL, 再加样本稀释液 40μL; 空白孔不加。
- 4、除空白孔外, 标准品孔和样本孔中每孔加入辣根过氧化物酶 (HRP) 标记的竞争抗原 50μL, 用封板膜封住反应孔, 37℃ 水浴锅或恒温箱温育 60min。
- 5、弃去液体, 吸水纸上拍干, 每孔加满洗涤液, 静置 1min, 甩去洗涤液, 吸水纸上拍干, 如此重复洗板 5 次 (也可用洗板机洗板)。
- 6、每孔加入底物 A、B 各 50μL, 37℃ 避光孵育 15min。
- 7、每孔加入终止液 50μL, 15min 内, 在 450nm 波长处测定各孔的 OD 值。

## 七、结果判断

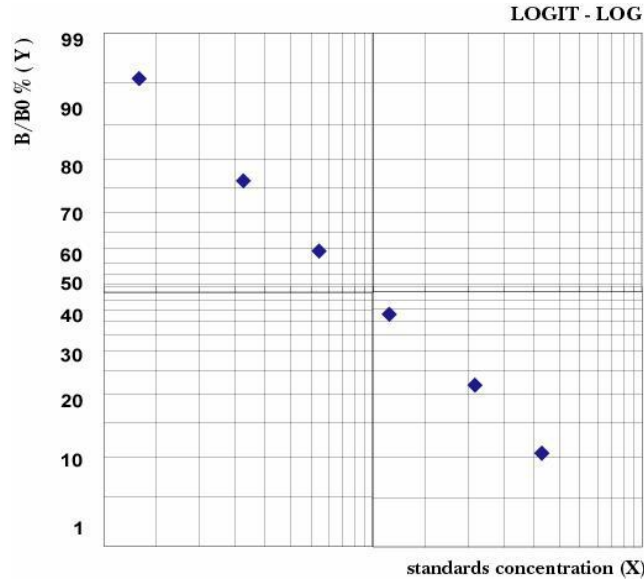
- 1、15 分钟内在波长 450nm 的酶标仪上读取各孔的 OD 值。
- 2、百分结合率计算: 设 S<sub>0</sub> 管计数为 B<sub>0</sub>, 各标准管或样品管计数为 B, 非特异管计数为 NSB, 则百分结合率计算公式如下:  $B/B_0 = (B - NSB)/(B_0 - NSB) \times 100\%$ 。
- 3、logit 计算: 各标准点或样品管的 logit 值计算公式如下:  $\text{logit} = \ln(B/B_0)/(1 - B/B_0)$ 。
- 4、将标准品的 OD 均值与标准品 0 点的 OD 均相除, 为标准点的百分结合率, 在 log-logit 坐标纸上绘图。
- 5、Log-logit 双对数标准曲线: 坐标纸上横轴从左至右第一个 1-9 表示为第一个 10 进位, 第二个 1-9 表示为第二个 10 进位。第三个 1-9 表示为第三个 10 进位。坐标纸纵轴为百分比 (1-99), 即各标准吸光值的百分结合率。取一条通过各点的直线。要求尽可能多的点在线上, 同时剩余的点均匀分布在直线的两边。样品也同样由吸光值计算百分结合率, 再从纵轴上的相应结合率找到直线上的点, 此点对应的横坐标浓度即为样品的浓度, 无需换算。
- 6、人工处理: 以标准浓度取 log 值为横坐标, 对应的 logit 值为纵坐标在普通坐标纸上或以

标准浓度为横坐标, 对应的 B/B0 为纵坐标在 logit-log 坐标纸上画出标准曲线 (理想化时是一条直线)。根据待测样品的 B/B0 可以从坐标纸上查出样品的浓度值。如果使用普通坐标纸, 查出的数值应取反对数才是最后的浓度值。

7、自动处理: 使用 logit-log 或四参数数据处理模式, 由电脑自动计算得出结果。

8、敏感度: 1.0ng/mL。

9、图例



## 八、试剂盒性能

- 1、准确性: 标准品线性回归与预期浓度相关系数 R 值  $\geq 0.9900$ 。
- 2、灵敏度: 最低检测浓度小于 1.0ng/mL。
- 3、特异性: 不与其它可溶性结构类似物交叉反应。
- 4、重复性: 板内、板间变异系数均小于 15%。
- 5、贮藏: 2-8℃, 避光防潮保存。
- 6、有效期: 6 个月。

## 九、注意事项

- 1、试剂盒保存在 2-8℃, 使用前室温平衡 20 分钟。从冰箱取出的浓缩洗涤液会有结晶, 这属于正常现象, 水浴加热使结晶完全溶解后再使用。
- 2、实验中不用的板条应立即放回自封袋中, 密封 (低温干燥) 保存。
- 3、浓度为 0 的 S0 号标准品即可视为阴性对照或者空白; 按照说明书操作时样本已经稀释 5 倍, 最终结果乘以 5 才是样本实际浓度。
- 4、严格按照说明书中标明的时间、加液量及顺序进行温育操作。
- 5、所有液体组分使用前充分摇匀。

## 十、免责声明

- 1、试剂盒仅供研究使用, 不得用于临床实验或人体实验, 否则所产生的一切后果, 由实验者承担, 本公司概不负责。
- 2、严格按照说明书操作, 实验者违反说明书操作, 后果由实验者承担。