

## Human Vitamin D BP ELISA Kit

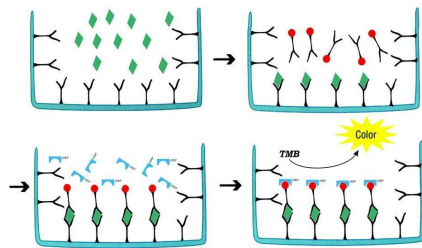
货号: BN50181

规格: 48T; 96T

本试剂盒用于定量检测人血清、血浆或细胞培养上清液等样本中天然和重组 Vitamin D BP 浓度。**使用前请仔细阅读说明书并检查试剂组分。**

### 检测原理:

本实验采用双抗体夹心 ELISA。用抗人 Vitamin D BP 单克隆抗体预包被酶标板, 加入适度稀释的样本和标准品, 其中的 Vitamin D BP 会与其单抗结合, 洗去游离成分; 加入生物素化的抗人 Vitamin D BP 抗体, 抗人 Vitamin D BP 抗体与结合在单抗上的人 Vitamin D BP 结合而形成免疫复合物, 洗去游离的成分; 加入辣根过氧化物酶标记的亲合素, 生物素与亲合素特异性结合, 洗去未结合的酶结合物; 加入显色剂, 若反应孔中有 Vitamin D BP, 辣根过氧化物酶会使无色的显色剂现蓝色; 加终止液变黄。在 450nm 下测 OD 值, Vitamin D BP 浓度与 OD450 值之间呈正比, 可通过绘制标准曲线计算出标本中 Vitamin D BP 浓度。



检测原理示意图

### 试剂盒组成:

| 试剂盒组成          | 96t  | 48t | 配制        |
|----------------|------|-----|-----------|
| 1a 标准品         | 2 支  | 1 支 | 按说明书进行稀释  |
| 1b 标准品和标本稀释液   | 4 瓶  | 2 瓶 | 即用型       |
| 2a 浓缩生物素化抗体    | 2 支  | 1 支 | 按瓶签标识进行稀释 |
| 2b 生物素化抗体稀释液   | 1 瓶  | 1 瓶 | 即用型       |
| 3a 浓缩酶结合物 (避光) | 2 支  | 1 支 | 按瓶签标识进行稀释 |
| 3b 酶结合物稀释液     | 1 瓶  | 1 瓶 | 即用型       |
| 4 浓缩洗涤液 20×    | 1 瓶  | 1 瓶 | 按瓶签标识进行稀释 |
| 显色剂 (避光)       | 1 瓶  | 1 瓶 | 即用型       |
| 终止液            | 1 瓶  | 1 瓶 | 即用型       |
| 抗体包被板条         | 8×12 | 8×6 | 即用型       |
| 封板胶纸           | 4 张  | 2 张 | 即用型       |
| 说明书            | 1 份  | 1 份 |           |

### 储存条件:

| 未启封的试剂盒             | 4℃ 保存, 请于保质期内使用。                                  |
|---------------------|---|
| 1b 标准品和标本稀释液        | 可以整盒放入 4℃ 储存 1 个月。<br>2a 浓缩生物素化抗体和 3a 浓缩酶结合物需用现配。 |
| 2a 浓缩生物素化抗体 (100×)  |   |
| 2b 生物素化抗体稀释液        |   |
| 3a 浓缩酶结合物 (避光 100×) |   |
| 3b 酶结合物稀释液          |   |
| 4 浓缩洗涤液 20×         | 4℃ 或常温保存  |
| 显色剂 (避光)            |   |
| 终止液                 | 重溶后分装, -20℃ 存放一个月, 避免反复冻融。稀释后的标准品使用后应丢弃, 不得重复使用。  |
| 标准品                 |   |
| 抗体包被板条              | 实验中不用的板条应立即放回包装袋中, 密封干燥 4℃ 保存。                    |

以上储存条件均要求在试剂盒保质期内。

### 其它实验材料(不提供, 但可协助购买):

1. 酶标仪(450nm)
2. 高精度可调移液器及吸头: 0.5-10,2-20,20-200,200-1000μl。  
一次检测样品较多时, 最好用多通道移液器。
3. 自动洗板机或洗瓶
4. 37℃ 温箱
5. 双蒸水或去离子水
6. 坐标纸
7. 量筒

### 注意事项:

1. 试剂盒保存在 2-8℃, 除复溶后的标准品, 其它成分不可冷冻。
2. 浓缩生物素化抗体(2a)、浓缩酶结合物(3a)装量极少, 运输中颠簸和可能的倒置会使液体沾到管壁或瓶盖。使用前请离心处理以使附着于管壁或瓶盖的液体沉积到管底。
3. 不同批号试剂不可混用。
4. 为避免交叉污染请使用一次性吸头。
5. 终止液和显色剂具腐蚀性, 避免皮肤及粘膜直接接触, 一旦接触到这些液体, 请尽快用大量水冲洗。
6. 使用干净的塑料容器配制洗涤液, 使用前充分混匀试剂盒里的各种成份及样品。
7. 洗涤酶标板时应充分拍干, 不要将吸水纸直接放入酶标反应孔中吸水。

本产品仅用于科研

8. 不要用其它来源的试剂混合或替代该产品的组分,不同批号的试剂盒组份不能混用,请在有效日期内使用本产品。
9. 在试验中标准品和样本检测时建议作双复孔或三复孔,加入试剂的顺序应一致,以保证所有反应孔孵育的时间一样。
10. 充分混匀对反应结果尤为重要,最好使用微量振荡器(使用最低频率进行振荡)。
11. 避免操作过程中酶标板干燥,干燥会使酶标板上生物成分迅速失活,影响实验结果。
12. 适当的稀释样品,使样品值落在标准曲线范围内,根据待测因子含量高、中、低的不同,建议采用1:100、1:10、1:2稀释样品。如果样品OD值高于最高标准,适当增加稀释度并重复检测。
13. 标准品稀释液,操作人,移液方式,洗涤方法,孵育时间及温度,试剂盒批次的不同均可能会导致结果的差异。
14. 此法可有效的消除可溶性受体、结合蛋白以及生物样品中的其他因素的干扰。

#### 样品收集、处理及保存方法:

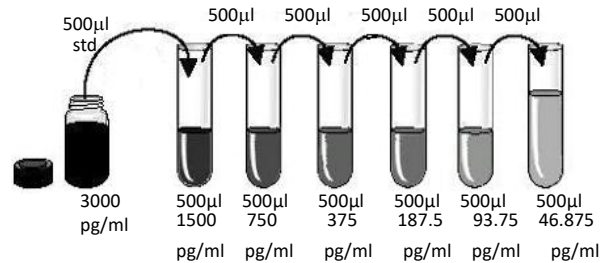
1. **血清:** 使用不含热原和内毒素的试管,收集血液后,室温凝血30min, 1000×g离心10min,小心分离血清。
2. **血浆:** 用EDTA、肝素作为抗凝剂收集血浆,收集后30min内以1000×g离心15min去除颗粒。
3. **细胞上清液:** 1000×g离心10min去除颗粒和聚合物。
4. **尿液:** 收集晨起中段尿于干净容器中,离心去除颗粒物。
5. **保存:** 若样品不立即检测,请将其按一次用量分装,-20℃—-70℃保存,避免反复冻融。尽量避免使用溶血或高血脂样本。如果血清中含有大量颗粒,检测前先离心或过滤去除;室温下解冻,请勿于37℃或更高的温度加热解冻。
6. **稀释:** 可根据实际情况,将标本做适当倍数稀释(建议做预实验,以确定稀释倍数)。

#### 试剂准备:

1. 提前30min从冰箱中取出试剂盒,平衡至室温。
2. **洗涤缓冲液:** 从冰箱中取出的浓缩洗涤液可能有结晶,这属于正常现象,加热并轻轻摇晃使结晶完全溶解后再配制。将浓缩洗涤液用双蒸水稀释(1:20)。未用完的放回4℃。
3. **标准品:** 加入标准品/标本稀释液(1b)1.0ml至冻干标准品(1a)中,待彻底溶解后,静置15分钟混匀(浓度为3000pg/ml),然后根据需要稀释,见下图(建议标准曲线使用以下浓度: 3000、1500、750、375、187.5、93.75、46.875、0 pg/ml)。稀释的标

准品不得重复使用,未用完的标准品应按照一次用量分装后,将其放在-20~-70℃贮存,一次性使用,避免反复冻融。

#### 标准品稀释方法



4. **生物素化抗体工作液:** 根据每孔需要100µl来计算总的用量,多配制100-200µl。以生物素化抗体稀释液(2b)稀释浓缩生物素化抗体(2a)(1:100)。最好现用现配。(稀释方法参照“下表”)
5. **酶结合物工作液:** 以酶结合物稀释液(3b)稀释浓缩酶结合物(3a)(1:100)。最好现用现配。(稀释方法参照“下表”)

#### 浓缩生物素化抗体及浓缩酶结合物稀释方法

| 所用板条数 | 浓缩酶结合物 | + | 酶结合物稀释液 |
|-------|--------|---|---------|
| 12    | 110µL  | + | 10890µL |
| 10    | 90µL   | + | 8910µL  |
| 8     | 70µL   | + | 6930µL  |
| 6     | 50µL   | + | 4950µL  |
| 4     | 33µL   | + | 3267µL  |
| 2     | 17µL   | + | 1683µL  |
| 1     | 9µL    | + | 891µL   |

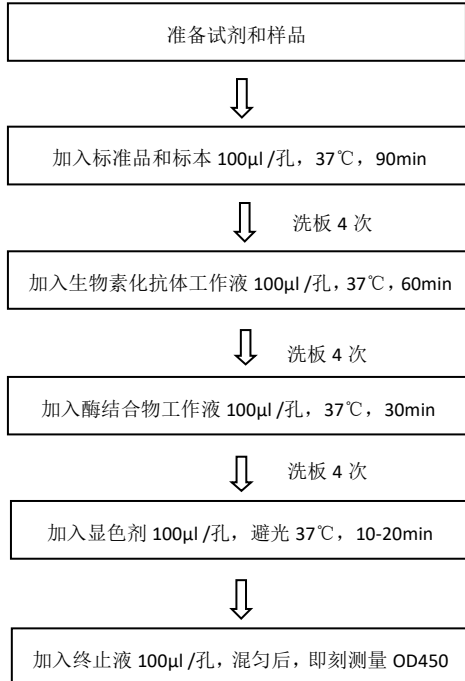
#### 操作步骤:

1. 按照上述准备工作配制好各种溶液。
2. 根据待测样品数量和标准品的数量决定所需的板条数,并增加1孔作为空白对照孔。分别将标本和不同浓度标准品(100µl/孔)加入相应孔中(零孔只加标准品/样本稀释液),用封板胶纸封住反应孔,37℃孵箱孵育90分钟(空白对照孔除外)。
3. 洗板4次:(1)自动洗板机:要求注入的洗涤液为350µl,注入与吸出间隔15-30秒。(2)手工洗板:甩尽孔内液体,每孔加洗涤液350µl,静置30秒后甩尽液体,在厚迭吸水纸上拍干。
4. 加入生物素化抗体工作液(100µl/孔)。用封板胶纸封住反应孔,37℃孵箱孵育60分钟(空白对照孔除外)。
5. 洗板4次。
6. 加入酶结合物工作液(100µl/孔)。用封板胶纸封住反应孔,37℃孵箱孵育30分钟(空白对照孔除外)。
7. 洗板4次。

- 加入显色剂100 $\mu$ l/孔，避光，37 $^{\circ}$ C孵箱孵育10-20分钟。
- 加入终止液100 $\mu$ l/孔，混匀后即刻测量OD450值(5分钟内)。

- 若标本 OD 值高于标准曲线上限，应适当稀释后重测，计算浓度时应乘以稀释倍数算标本含量。

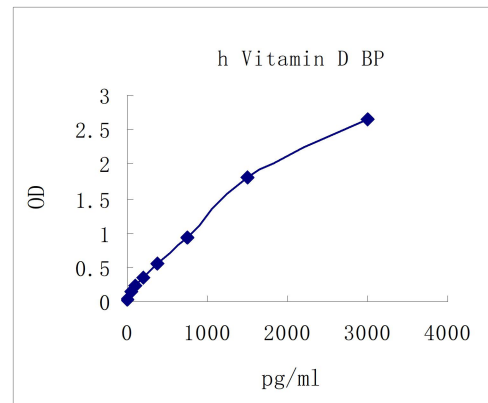
**操作流程图:**



- 参考数据:

| 标准品浓度 (pg/ml) | OD值1  | OD值2  | 平均值   | 矫正值   |
|---------------|-------|-------|-------|-------|
| 0             | 0.041 | 0.045 | 0.043 | ---   |
| 46.875        | 0.138 | 0.136 | 0.137 | 0.094 |
| 93.75         | 0.236 | 0.228 | 0.232 | 0.189 |
| 187.5         | 0.362 | 0.356 | 0.359 | 0.316 |
| 375           | 0.558 | 0.551 | 0.555 | 0.512 |
| 750           | 0.934 | 0.943 | 0.939 | 0.896 |
| 1500          | 1.791 | 1.797 | 1.294 | 1.251 |
| 3000          | 2.664 | 2.666 | 2.665 | 2.622 |

数据仅供参考，不同用户最佳显色时间会有所不同



本图仅供参考，应以同次试验标准品所绘标准曲线为准

**操作要点提示:**

- 配制各种试剂时要充分混匀，但要避免产生大量泡沫，以免加样时加入大量的气泡，产生加样误差。
- 为避免交叉污染，在加入不同浓度的标准品、不同样品、不同试剂时谨记及时更换吸头。
- 为了确保准确的结果，在每次孵育前均需使用新封板胶纸封住反应孔。
- 显色剂在添加之前，应保持无色，请勿使用已变为蓝色的显色溶液。最佳显色时间对标准曲线很重要，肉眼可见前 3-4 孔有梯度蓝色，后 3-4 孔差别不明显，零孔无蓝色出现即可终止。
- 每次检测均要做标准曲线，根据样品待测因子的含量，适当稀释或浓缩样本，最好做预实验。

**结果判断:**

- 每个标准品和标本的OD值应减去空白孔的OD值，如果做复孔，求其平均值。
- 使用计算机软件以吸光度OD值为纵坐标(Y)，相应的Vitamin D BP标准品浓度为横坐标(X)，生成相应的标准曲线，样品的Vitamin D BP含量可根据其OD值由标准曲线换算出相应的浓度。

**结果重复性:**

板间，板内变异系数均<10%。

**灵敏度:**

最低检测人 Vitamin D BP 剂量小于 23 pg/ml。最低检出量测定方法：20 个零标准的平均 OD 值增加两个标准差，再计算相应的浓度。

**ELISA检测常见问题分析及解决办法:**

| 问题  | 可能原因               | 解决办法  | 问题                                   | 可能原因   | 解决办法  |  |
|-----|--------------------|---|--------------------------------------|--|---|--|
| 无颜色 | 不同试剂盒或不同批号的试剂混合    | 重新检查试剂的标签, 确保所有组分都属于正使用的试剂盒中的。不能混用不同试剂盒或不同批号的试剂。  | 全部板子变成规则的蓝色                          | 不充分的洗涤/洗涤步骤被遗漏使没结合的 HRP 仍有残留   | 最好使用洗板机充分洗涤<br>检查每孔是否有残留的洗液或加样量是否准确                             |  |
|     | 漏加酶                | 检查操作流程, 注意不要漏加  |                                      | 太多的酶结合物  | 检查稀释度, 必要时进行效价测定  |  |
|     | HRP 酶污染了叠氮钠        | 使用新配制的试剂, 禁含叠氮钠   |                                      | 封板膜或试剂容器被重复使用, 导致 HRP 残留, 使 TMB 底物产生非特异蓝色  | 使用新封板膜, 每步使用不同的试剂容器   |  |
|     | 试剂配制/使用有误          | 重做试验, 严格按说明书操作, 每次配制和使用前看清标签  |                                      |  |   |  |
| 显色弱 | 超过有效期的产品可能会产生很弱的信号 | 检查产品有效期   | 高 CV 值花板                             | 操作不慎或洗涤不充分   | 按说明书洗板、加样和显色, 洗板尤为重要<br>确定每两步骤间酶板应保持湿润<br>使用封板膜封口, 注意每步使用新鲜的封板膜 |  |
|     | 缩短孵育时间能使实验信号变弱     | 检查孵育时间  |                                      | 出现干板, 没有使用封板膜、封板膜重复使用  | 检查并校准移液器, 每次取样必须更换吸头  |  |
|     | 使用了被污染的试剂          | 检查试剂是否被污染   |                                      | 移液器不准确, 吸头重复使用   | 检查稀释度, 必要时进行效价测定<br>检查稀释度, 必要时进行效价测定<br>延长底物孵育时间                |  |
|     | 仪器设定不正确, 滤光片不匹配    | 仪器是否设定正确, 滤光片的使用等   | 标准曲线可得到, 但两点之间区别很差 (低或平的曲线)          | 酶结合物不足   | 检查稀释度, 必要时进行效价测定  |  |
|     | 洗涤操作不规范            | 洗涤不充分, 使用手工洗板常出现洗瓶洗涤, 每孔应完全充满洗涤缓冲液, 倾出时应迅速<br>若用洗板机, 应校准并设定足够充满每孔的体积量。板内侧不应接触设备<br>检查每孔是否有残留的洗液或每孔加样量的体积是否准确<br>可在两次洗板之间加 30 秒的浸泡 |                                      | 检测抗体不足   | 检查稀释度, 必要时进行效价测定  |  |
|     |                    |   |                                      | 板子显色不足   | 使用推荐品牌的底物溶液   |  |
|     |                    |   |                                      | 标准曲线很好, 但没有任何期望的阳性信号   | 标本中无相应的待检测物质<br>标本基质遮盖检测  | 使用内参对照<br>重复实验, 重新考虑实验的相应参数<br>将标本至少做 1:2 相应的稀释, 或进行系列稀释 |
|     |                    |   |                                      | 标准曲线很好, 但标本的判读值很高  | 标本中含的待检物质水平超过实验范围   | 稀释标本   |
|     | 高背景                | 实验中孵育温度和时间不适当   | 确定每一试验步骤的孵育温度和时间是否适当                 | 边缘效应   | 工作环境温度不均衡   | 避免将板子在变化温度环境中孵育  |
|     |                    | 酶加量过多   | 加酶前查看移液器调节量是否准确<br>检查稀释度, 若必要时进行效价测定 | 漂移   | 实验过程中出现间断   | 整个实验应连续操作, 在实验开始前将所有的标准品和标本做适当的准备。                       |
|     |                    | 试剂没有按说明书平衡至室温   | 在所有试剂加入孔前, 确保它们已平衡至室温, 除非说明书中有另外的要求。 |  |   |  |
|     |                    | 是否可更改试剂盒所提供的操作步骤?   |                                      | 一般厂商为确保最高的灵敏度, 对试剂盒都进行了优化, 为确保每一试剂盒实验的规范性应按说明书操作。                                  |   |  |
|     |                    | 是否可混用不同批次试剂盒中的试剂?   |                                      | 不可以, 绝大多数试剂在每批试剂盒中是特异的, 若有问题可与厂家或代理商联系。  |   |  |
|     |                    | 是否可增加或减少标本的体积?  |                                      | 商品化的试剂盒所需加入的标本体积是优化的, 应按说明书操作, 不建议更改所加标本体积。  |   |  |
|     |                    | 是否可重新确定自己的标准曲线的点?   |                                      | 可以。说明书上有建议制备标准曲线时标准品的稀释度, 可改变稀释倍数和增加曲线的点, 但是必须在实验范围内, 高于试剂盒中最高标准品的点和低于灵敏度以下的点是无效的。 |   |  |