(仅供科研使用，不得用于临床诊断!)

25 羟基维生素 D3（25(OH)D3)

使用说明书

货号：YPJV1114

规格：48T/96T

使用前请仔细阅读说明书。如果有任何问题，请通过以下方式联系我们：

官方热线：400-999-8863

技术电话：18358180525

邮箱：UpingBio@163.com

公司网址：www.upingbio.com

具体保质期请见试剂盒外包装标签。请在保质期内使用试剂盒。

联系时请提供产品货号、生产日期（见盒签），以便我们更高效为您服务。

试剂盒性能

物理性能：各液体组分澄清透明、无沉淀或者絮状物。微孔板铝箔袋应真空包装，无破损漏气。

标准曲线线性：校准品剂量反应曲线相关系数 r 值，大于等于 0.9900。

精密度：批内变异系数 CV%小于 10%；批间变异系数 CV%小于 15%。

灵敏度：最低检出剂量小于 1.0 ng/mL。

回收率：回收率在 85%-115%之间。

敏感性：本试剂盒识别天然和重组 25 羟基维生素 D3（25(OH)D3)

，与结构类似物无交叉。

稳定性：2℃-8℃保存，有效期 6 个月。

检测范围：12.5-200 ng/mL。

用途：用于检测血清、血浆、组织、细胞培养上清液等样本中 25 羟基维生素 D3（25(OH)D3)

的浓度。

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 Assay Diluent，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，对样本中 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	0.2ml/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
Assay Diluent	12mL	用于分离 25 羟基维生素 D3(25(OH)D3)与结合蛋白
样本稀释液	6mL	PBS
TMB	12mL	TMB 工作液
终止液	12mL	酸性溶液
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：200、100、50、25、12.5、0 ng/mL。

注意：

1：使用前请检查试剂盒中试剂的标签和数量与表格是否一致。

2：如果试剂盒的组份需要再次使用，请确保上一次使用之后没有被污染。

3：酶标板单次未使用完，要谨记密封放到 2-8℃保存。

试验所需自备试验器材（不提供，但可协助购买）

1.标准规格酶标仪。

2.自动洗板机。

3.振荡器。

4.系列可调节移液器及吸头，一次检测样品较多时，最好用多通道移液器。

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、 使用试剂盒配套的样品稀释液。

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、 待测样本中存在的人抗鼠等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。

注意事项

1)本试剂盒仅供体外研究使用，不用于临床诊断。

2)试验中请穿着实验服并戴乳胶手套做好防护工作。特别是检测血液或者其他体液样品时，请按国家生物试验室安全防护条例执行。

3)严格按照规定的时间和温度进行温育以保证准确结果。所有试剂都必须在使用前达到室温20-25℃。使用后立即冷藏保存试剂。

4)洗板不正确可以导致不准确的结果。在加入底物前确保尽量吸干孔内液体。温育过程中不要

让微孔干燥掉。

5)消除板底残留的液体和手指印，否则影响 OD 值。

6)底物显色液应呈无色或很浅的颜色。

7)避免试剂和标本的交叉污染以免造成错误结果。

8)在储存和温育时避免强光直接照射。

9)平衡至室温后再打开密封袋以防水滴凝聚在冷板条上。

10)任何反应试剂不能接触漂白溶剂或漂白溶剂所散发的强烈气体。任何漂白成分都会破坏试剂盒中反应试剂的生物活性。

11)检测使用的酶标仪需要安装能检测 450±10nm 波长的滤光片，光密度范围在 0-3.5 之间。建议使用时提前 15 分钟预热。

12)请勿使用其他批号或其他来源的试剂混合或替代本试剂盒中的试剂。

13)试验中所用的 EP 管和吸头均为一次性使用，严禁混用。

14)请勿使用过期的试剂。

样品的准备和保存

以下只是列出样品采集和保存的一般指南。所有样本采集保存过程中，不得使用叠氮钠做为防腐剂。样品如果不立即分析，应分装后冷冻保存，且避免反复冻融。

细胞培养上清——离心去除沉淀，立即分析或分装后-20℃冷冻保存。

血清——用干净试管收集血液，室温凝固 30 分钟，离心 2000×g 20 分钟，收集血清。立即分析或分装后-20℃冷冻保存。

血浆——采用肝素、柠檬酸盐或 EDTA 抗凝，抽血后 30 分钟内在 2-8℃离心 2000×g 20 分钟。为消除血小板的影响，建议在 2-8℃进一步离心 10000×g 10 分钟。立即分析或分装后-20℃冷冻保存。

细胞裂解液——对于贴壁细胞，去除培养液，用 PBS、生理盐水或无血清培养液洗一遍。加入适量裂解液，用枪吹打数下，使裂解液和细胞充分接触。通常 10 秒后，细胞就会被裂解。对于悬浮细胞，离心收集细胞，用 PBS、生理盐水或无血清培养液洗一遍。加入适量裂解液，用枪吹打把细胞吹散，用手指轻弹以充分裂解细胞。充分裂解后，10000—14000×g 离心 3-5 分钟， 取上清。立即分析或分装后-20℃冷冻保存。

尿液——用无菌管收集，离心 2000×g 20 分钟。仔细收集上清。如有沉淀形成，应再次离心。

组织匀浆——组织样本一般制成组织匀浆，处理方法如下：

1.1、将目标组织置于冰上，用预冷的 PBS 缓冲液(0.01M，pH=7.4)洗涤去除残留的血液，称重后备用。

1.2、在冰上用裂解液研磨组织匀浆。加入裂解液的体积取决于组织的重量，一般情况每 0.1g 组织碎片使用 0.9ml 裂解液。另外建议在裂解液中加入蛋白酶抑制剂，如 1mM PMSF。

1.3、可再利用超声破碎或反复冻融进一步处理(超声破碎过程中，需冰浴降温；反复冻融法可重复 2 次)。

1.4、将制备好的匀浆液于 5000×g 离心 5 分钟，留取上清即可检测。或按一次使用量分装冻存于-20°C 或-80°C。

1.5、根据实验需要，组织匀浆样本可先测定总蛋白浓度,以便于数据分析，推荐 BCA 法。一般调整总蛋白浓度至 1-3mg/ml 用于 ELISA 检测。某些组织样本，如肝脏，肾脏，胰腺因含有较高浓度的内源性过氧物酶，在样品浓度较高的情况下会和显色底物反应，出现假阳性。可尝试使用 1%H2O2 灭活 15min 再检测。

注意：裂解液常用 PBS 缓冲液，或使用中等强度 RIPA 裂解液。使用 RIPA 裂解液时，PH 值需调整为 PH7.3，避免使用含 NP-40，Triton X-100 和 DTT 的组分，会严重抑制试剂盒工作。推荐使用 50mM Tris+0.9%NaCL+0.1% SDS,PH 7.3。

试剂准备

1、 使用前，所有的组分都要至少复温 120min，确保充分复温到室温。

2、 浓缩洗涤液：从冰箱取出的浓缩洗涤液，会有结晶产生，这属于正常现象，水浴加热使结晶完全溶解。浓缩洗涤液与蒸馏水，按 1:20 稀释，即 1 份的浓缩洗涤液，添加 19 份的蒸馏水。

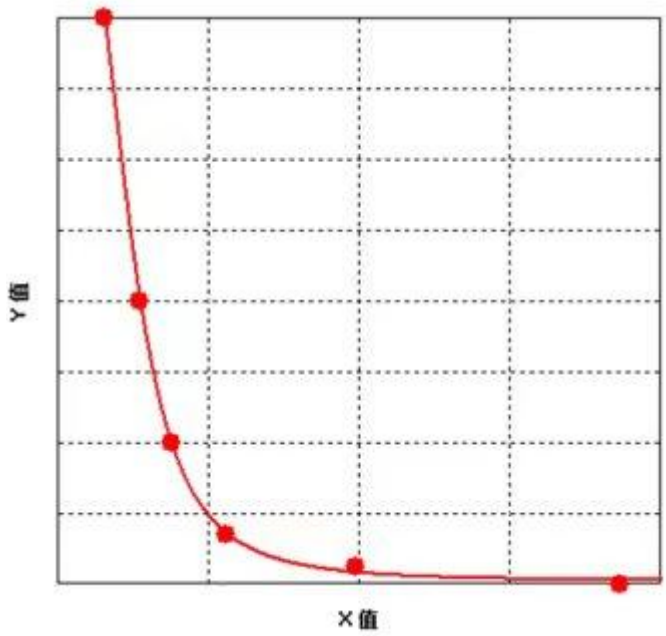
操作程序

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 Assay Diluent 100μl，混匀，贴上封板膜，置室温（20℃-25℃）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℃）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 TMB 100μl，振荡混匀后，置室温（20℃-25℃）避光显色 15 分钟，每孔加终止液 100μl。
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

9、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，通过样本的吸光度（OD 值），利用方程计算样品的浓度值。【用 ELISA Calc 软件计算】

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



（示意图，仅供参考）

[问题分析]

若实验效果不好，请及时对显色结果拍照，保存实验数据，保留所用板条及未使用试剂，然后联系我公司技术支持为您解决问题。同时您也可以参考以下资料：

[问题解答]

问题描述	可能原因	相应对策相应对策
标准曲线梯度差	吸液或加液不准	检查移液器及吸头
	平衡时间太短	保证充足的平衡时间
	洗涤不完全	保证洗涤时间和洗涤次数及每孔的加液量
显色很弱或无色	孵育时间太短	保证充足的孵育时间
	实验温度不正确	使用推荐的实验温度
	试剂体积不够或漏加	检查吸液及加液过程，保证所有试剂按顺序足量添加
	稀释不正确	
	酶标记物失活或底物失效	混合酶结合物和底物，通过迅速显色来检查判断
读数数值低	酶标仪设置不正确	在酶标仪上检查波长及滤光片设置
		提前打开酶标仪预热
变异系数大	加液不正确	检查加液情况
背景值高	检测抗体的工作浓度过高	使用推荐的稀释倍数
	酶标板洗涤不完全	保证每步清洗完全；如果用自动洗板机，请检查所有的出口是否有堵塞；是否使用试剂盒配备的洗涤液
	洗液有污染	配制新鲜的洗液
灵敏度低	ELISA 试剂盒保存不当	按说明书要求保存相关试剂
	读数前未终止	OD 读数前应在每孔中加入终止液

[声明]

1. 限于现有条件及科学技术水平，尚不能对所有原料进行全面的鉴定分析，本产品可能存在一定的质量技术风险。

2. 本试剂盒在研发过程中去除/降低了生物学样本中的一些内源性干扰因素，并非所有可能影响的因素均已去除。

3. 最终的实验结果与试剂的有效性、实验者的相关操作以及当时的实验环境等因素密切相关，本公司只对试剂盒本身负责，不对因使用试剂盒所造成的样本消耗负责，请使用者使用前充分考虑到样本可能的使用量，预留充足的样本。

4. 为了达到好的实验结果，请只使用本公司试剂盒内提供的试剂，不要混用其他制造商的产品，严格按照说明书操作。

5. 由于操作过程中试剂制备以及酶标仪参数设置不正确，可能导致结果异常，实验前请仔细阅读说明书并调整好仪器。

6. 即使是相同人员操作也可能在两次独立实验中得到不同的结果，为保证结果的重现性，需要控制实验过程中每一步的操作。

7. 试剂盒发货前会经过严格的质检，然而，因为运输条件、实验设备差异等等因素影响，用户检测结果可能跟出厂数据不一致。

8. 本试剂盒未与其他厂家同类试剂盒或不同方法检测同一目的物的产品进行对比，所以不排除检测结果不一致的情况。

9. 试剂盒仅供研究使用，如将其用于临床诊断或任何其他用途，我公司将不对因此产生的问题负责，亦不承担任何法律责任。