本试剂盒只能用于科学研究，不得用于医学诊断

犬（Canine）1,25-二羟基维生素 D3（1,25(OH)2D3）ELISA 检测试剂盒

使用说明书

检测原理

试剂盒采用双抗体一步夹心法酶联免疫吸附试验（ELISA）。往预先包被1,25-二羟基维生素D3（1,25(OH)2D3）抗体的包被微孔中，依次加入标本、标准品、HRP标记的检测抗体，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1,25-二羟基维生素D3（1,25(OH)2D3）呈正相关。用酶标仪在450nm 波长下测定吸光度（OD 值），计算样品浓度。

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，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：EDTA、柠檬酸盐或肝素抗凝。3000 转离心 30 分钟取上清。

3. 细胞上清液：3000 转离心 10 分钟去除颗粒和聚合物。

4. 组织匀浆：将组织加入适量生理盐水捣碎。3000 转离心 10 分钟取上清。

5. 保存：如果样本收集后不及时检测，请按一次用量分装，冻存于-20℃，避免反复冻融，在室温下解冻并确保样品均匀地充分解冻。

自备物品

1. 酶标仪（450nm）

2. 高精度加样器及枪头：0.5-10uL、2-20uL、20-200uL、200-1000uL

3. 37℃恒温箱

操作注意事项

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。

试剂盒组成

名称	96 孔配置	48 孔配置	备注
微孔酶标板	12 孔×8 条	12 孔×4 条	无
标准品	0.3mL*6 管	0.3mL*6 管	无
样本稀释液	6mL	3mL	无
检测抗体-HRP	10mL	5mL	无
20×洗涤缓冲液	25mL	15mL	按说明书进行稀释
底物 A	6mL	3mL	无
底物 B	6mL	3mL	无
终止液	6mL	3mL	无
封板膜	2 张	2 张	无
说明书	1 份	1 份	无
自封袋	1 个	1 个	无

注：标准品（S0-S5）浓度依次为：0、0.25、0.5、1、2、4 ng/mL

试剂的准备

20×洗涤缓冲液的稀释：蒸馏水按 1：20 稀释，即 1 份的 20×洗涤缓冲液加 19 份的蒸馏水。

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。

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）标记的检测抗体 100μL，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

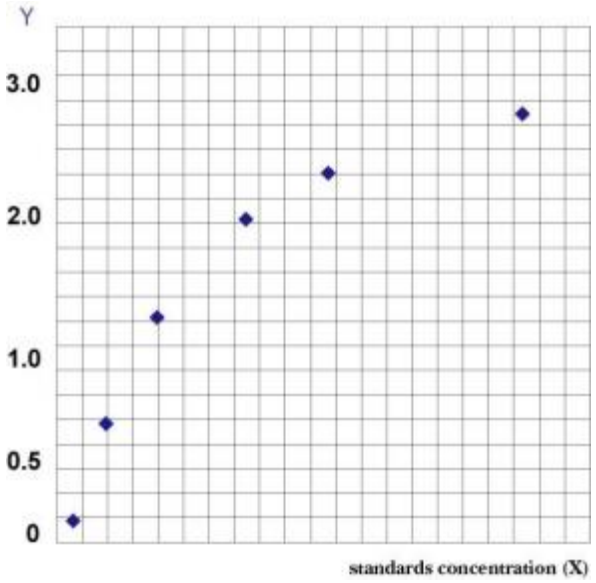
洗涤液，吸水纸上拍干，如此重复洗板5 次（也可用洗板机洗板）。

6. 每孔加入底物A、B 各50 μL，37℃避光孵育15min。

7. 每孔加入终止液50 μL，15min 内，在450nm 波长处测定各孔的OD 值。

结果判断

绘制标准曲线：在Excel 工作表中，以标准品浓度作横坐标，对应OD 值作纵坐标，绘制出标准品线性回归曲线，按曲线方程计算各样本浓度值。



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，大于等于0.9900。

2. 灵敏度：最低检测浓度小于0.1 ng/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

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。