

01.检测目的：

本试剂盒用于测定大鼠血清、血浆及相关液体样本中25羟基维生素D(25(OH)D)含量。

02.实验原理：

本试剂盒应用双抗体夹心法测定标本中大鼠25羟基维生素D(25(OH)D)水平。用纯化的大鼠25羟基维生素D(25(OH)D)抗体包被微孔板，制成固相抗体，往包被单抗的微孔中依次加入25羟基维生素D(25(OH)D)，再与HRP标记的25羟基维生素D(25(OH)D)抗体结合，形成抗体-抗原-酶标抗体复合物，经过彻底洗涤后加底物TMB显色。TMB在HRP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25羟基维生素D(25(OH)D)呈正相关。用酶标仪在450nm波长下测定吸光度（OD值），通过标准曲线计算样品中大鼠25羟基维生素D(25(OH)D)浓度。

03.试剂盒组成：

试剂盒组成	48 孔配置	96 孔配置	保存
说明书	1 份	1 份	
封板膜	2 片	2 片	
密封袋	1 个	1 个	
酶标包被板	1×48	1×96	2-8℃保存
标准品 (160IU/L)	0.5ml×1 管	0.5ml×1 管	2-8℃保存
酶标试剂	3 ml×1 瓶	6 ml×1 瓶	2-8℃保存
样品稀释液	3 ml×1 瓶	6 ml×1 瓶	2-8℃保存
标准品稀释液	1.5 ml×1 瓶	1.5 ml×1 瓶	2-8℃保存
显色剂 A 液	3 ml×1 瓶	6 ml×1 瓶	2-8℃保存
显色剂 B 液	3 ml×1 瓶	6 ml×1 瓶	2-8℃保存
终止液	3 ml×1 瓶	6 ml×1 瓶	2-8℃保存
浓缩洗涤液	20 倍 20ml×1 瓶	30 倍 20ml×1 瓶	2-8℃保存

1. 标准品的稀释：本试剂盒提供原倍标准品一支，用户可按照下列图表在小试管中进行稀释。

240ng/L	5号标准品	150 μ l 的原倍标准品加入 150 μ l 标准品稀释液
120ng/L	4号标准品	150 μ l 的 5号标准品加入 150 μ l 标准品稀释液
60ng/L	3号标准品	150 μ l 的 4号标准品加入 150 μ l 标准品稀释液
30ng/L	2号标准品	150 μ l 的 3号标准品加入 150 μ l 标准品稀释液
15ng/L	1号标准品	150 μ l 的 2号标准品加入 150 μ l 标准品稀释液



2. 加样：分别设空白孔（空白对照孔不加样品及酶标试剂，其余各步操作相同）、标准孔、待测样品孔。在酶标包被板上标准品准确加样 50 μ l，待测样品孔中先加样品稀释液 40 μ l，然后再加待测样品 10 μ l（样品最终稀释度为 5 倍）。加样将样品加于酶标板孔底部，尽量不触及孔壁，轻轻晃动混匀。



3. 温育：用封板膜封板后置 37 $^{\circ}$ C 温育 30 分钟。



4. 配液：将 30 倍浓缩洗涤液用蒸馏水 30 倍稀释后备用



5. 洗涤：小心揭掉封板膜，弃去液体，甩干，每孔加满洗涤液，静置 30 秒后弃去，如此重复 5 次，拍干。



6. 加酶：每孔加入酶标试剂 50 μ l，空白孔除外。



7. 温育：用封板膜封板后置 37 $^{\circ}$ C 温育 30 分钟。



8. 洗涤：小心揭掉封板膜，弃去液体，甩干，每孔加满洗涤液，静置 30 秒后弃去，如此重复 5 次，拍干。



9. 显色：每孔先加入显色剂 A 50 μ l，再加入显色剂 B 50 μ l，轻轻震荡混匀，37 $^{\circ}$ C 避光显色 10 分钟。



10. 终止：每孔加终止液 50 μ l，终止反应（此时蓝色立转黄色）。



11. 测定：以空白孔调零，450nm 波长依序测量各孔的吸光度（OD 值）。测定应在加终止液后 15 分钟以内进行。

07. 注意事项：

试剂盒从冷藏环境中取出应在室温平衡 15-30 分钟后方可使用，酶标包被板开封后如未用完，板条应装入密封袋中保存。

浓洗涤液可能会有结晶析出，稀释时可在水浴中加温助溶，洗涤时不影响结果。

各步加样均应使用加样器，并经常校对其准确性，以避免试验误差。一次加样时间最好控制在 5 分钟内，如标本数量多，推荐使用排枪加样。

请每次测定的同时做标准曲线，最好做复孔。如标本中待测物质含量过高（样本 OD 值大于标准品孔第一孔的 OD 值），请先用样品稀释液稀释一定倍数（n 倍）后再测定，计算时请最后乘以总稀释倍数（ $\times n \times 5$ ）。

封板膜只限一次性使用，以避免交叉污染。

底物请避光保存。

严格按照说明书的操作进行，试验结果判定必须以酶标仪读数为准。

所有样品，洗涤液和各种废弃物都应按传染物处理。

本试剂不同批号组分不得混用。

08. 计算数据：

以标准物的浓度为横坐标，OD 值为纵坐标，在坐标纸上绘出标准曲线，根据样品的 OD 值由标准曲线查出相应的浓度；再乘以稀释倍数；或用标准物的浓度与 OD 值计算出标准曲线的直线回归方程式，将样品的 OD 值代入方程式，计算出样品浓度，再乘以稀释倍数，即为样品的实际浓度。

09. 检测范围：

0.6ng/ml - 20ng/ml

10.保存条件及有效期:

1.试剂盒保存: 2-8°C。

2.有效期: 6个月

www.affandi-e.com