

# ELISA试剂盒使用说明书

## Mouse Vitamin D BP ELISA Kit

本试剂盒用于定量检测小鼠血清、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，如有任何疑问请与合肥兰杰柯科技有限公司联系，公司将为您提供强有力的技术支持。



全国统一热线：400-600-4213  
[www.biosharp.cn](http://www.biosharp.cn)

### 目录

|                |   |
|----------------|---|
| 一、产品简介         | 2 |
| 二、检测原理         | 2 |
| 三、试剂盒组分        | 3 |
| 四、储存条件         | 3 |
| 五、注意事项         | 3 |
| 六、其它实验材料       | 4 |
| 七、使用说明         | 4 |
| 1、样品收集、处理及保存方法 | 4 |
| 2、试剂准备         | 4 |
| 3、操作步骤         | 5 |
| 4、操作流程图        | 6 |
| 5、操作要点提示       | 6 |
| 6、结果判断         | 6 |
| 八、常见问题分析及解决    | 8 |

# Mouse Vitamin D BP (维生素D结合蛋白) ELISA KIT

| 货号           | 名称                                      | 规格  |
|--------------|-----------------------------------------|-----|
| BSEM-101-48T | Mouse Vitamin D BP (维生素D结合蛋白) ELISA KIT | 48T |
| BSEM-101-96T | Mouse Vitamin D BP (维生素D结合蛋白) ELISA KIT | 96T |

## 一、产品简介

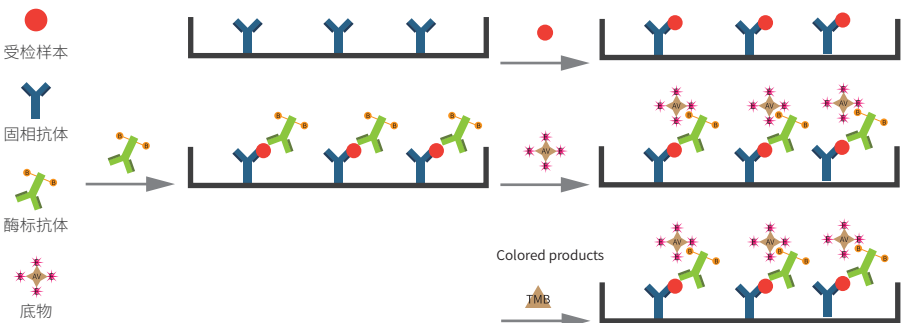
维生素D结合蛋白(维生素D BP),也称为DBP和Gc-球蛋白,是一种58 kDa的糖蛋白,在血清中以高浓度循环,并作为维生素D的载体蛋白。维生素D的运输BP对于多种组织的功能是重要的,并且维生素D BP活性的改变有助于许多疾病的发展。维生素D BP结合维生素D的25 (OH) 和激素活性1,25 (OH) 2形式。维生素D BP在结构上与主要血清蛋白白蛋白和α-胎蛋白相关。这些蛋白质共享内部二硫键模式, 将其分子分成三个结构域。成熟的小鼠维生素D BP分别与人和大鼠维生素D BP分别为76%和90%氨基酸序列同源性。维生素D BP主要在肝细胞中表达, 较小程序在肾脏中表达。它通过Megalin介导的胞吞作用将维生素D递送到细胞中。有一种选择性去糖基化形式的维生素D BP被称为巨噬细胞活化因子(MAF),它是依次通过B细胞的β-半乳糖苷酶和T细胞唾液酸酶去除碳水化合物而产生。除了促进巨噬细胞活化和分化, MAF还阻断CDGF依赖性过程中FGF basic, VEGF和血管生成素2对血管内皮细胞的血管生成作用。在小鼠异种移植模型中的MAF施用会导致新生血管形成和肿瘤消退减少。维生素D BP的完全去糖基化破坏其抗血管生成作用。

维生素D BP增强单核细胞和嗜中性粒细胞对活化的补体成分C5a或C5a des Arg (C末端加工形式的C5a)的趋化性。它不增强朝向单核细胞趋化因子f-Met-Leu-Phe的运动或作为独立的趋化因子起作用。维生素D BP结合C5a des Arg允许更多数量的C5a分子结合中性粒细胞。中性粒细胞活化导致维生素D BP和嗜中性粒细胞趋化性的结合位点的显著增加。维生素D BP另外与中性粒细胞和单核细胞上CD44的硫酸软骨素部分有相互作用。CD44以及膜联蛋白A2是维生素D BP增强趋化性所必需的。在凝血期间通过血小板释放并通过CD36作用的血小板反应蛋白-1需要维生素D BP形成完全的趋化辅因子功能。维生素D BP的趋化辅因子性质通过与1,25 (OH) 2维生素D结合而消除,但是其不通过与25 (OH) 维生素D或肌动蛋白的结合而改变性质。维生素D BP结合从坏死细胞释放的单体G-肌动蛋白并将其从循环中清除。

由于快速的清除, 维生素D BP的循环水平在肝衰竭, 肝病和囊性纤维化中降低。各种癌症的患者具有升高的α-N-乙酰半乳糖胺酶的血清水平, 该酶可用来去除维生素D BP上N-连接的碳水化合物。该作用不改变维生素D BP蛋白的水平, 但阻止MAF的形成, 其作用是抗血管生成。

## 二、检测原理

本实验采用双抗体夹心ELISA。用抗小鼠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; 加入生物素化的抗小鼠Vitamin D BP抗体, 抗小鼠Vitamin D BP抗体与结合在单抗上的小鼠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OD<sub>450</sub>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。



三、试剂盒组成

| 组分编号        | 组分         | 96t  | 48t | 储存条件 |
|-------------|------------|------|-----|------|
| BSEM-101-1  | 标准品        | 2支   | 1支  | -20℃ |
| BSEM-101-2  | 标准品和标本稀释液  | 1瓶   | 1瓶  | 2-8℃ |
| BSEM-101-3  | 浓缩生物素化抗体   | 2支   | 1支  | 2-8℃ |
| BSEM-101-4  | 生物素化抗体稀释液  | 1瓶   | 1瓶  | 2-8℃ |
| BSEM-101-5  | 浓缩酶结合物(避光) | 2支   | 1支  | 2-8℃ |
| BSEM-101-6  | 酶结合物稀释液    | 1瓶   | 1瓶  | 2-8℃ |
| BSEM-101-7  | 浓缩洗涤液20×   | 1瓶   | 1瓶  | 2-8℃ |
| BSEM-101-8  | 显色剂(避光)    | 1瓶   | 1瓶  | 2-8℃ |
| BSEM-101-9  | 终止液        | 1瓶   | 1瓶  | 2-8℃ |
| BSEM-101-10 | 抗体包被板条     | 8×12 | 8×6 | 2-8℃ |
| BSEM-101-11 | 封板胶纸       | 4张   | 2张  | 2-8℃ |
|             | 说明书        | 1份   | 1份  |      |

四、储存条件

未开封试剂盒2-8℃保存有效期6个月，启封后建议一个月内使用完毕。产品收到后标准品-20℃保存，其它组分2-8℃保存。

五、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、浓缩酶结合物装量极少，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。
- 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。

六、其它实验材料

- 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

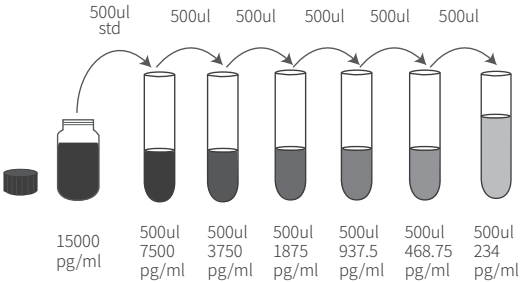
七、使用说明

7.1 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、柠檬酸盐、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.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。
- 5.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)。

7.2 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1.0mL至冻干标准品中, 待彻底溶解后, 静置15分钟混匀(浓度为15000pg/mL), 然后根据需要进行稀释, 见下图(建议标准曲线使用以下浓度: 15000、7500、3750、1875、937.5、468.75、234、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稀释浓缩生物素化抗体(1:100)。最好现用现配。

浓缩生物素化抗体稀释方法

| 所用板条数 | 浓缩生物素化抗体 | + | 生物素化抗体稀释液 |
|-------|----------|---|-----------|
| 12    | 110μL    | + | 10890μL   |
| 10    | 90μL     | + | 8910μL    |
| 8     | 70μL     | + | 6930μL    |
| 6     | 50μL     | + | 4950μL    |
| 4     | 33μL     | + | 3267μL    |
| 2     | 17μL     | + | 1683μL    |
| 1     | 9μL      | + | 891μL     |

5、酶结合物工作液：以酶结合物稀释液稀释浓缩酶结合物(1:100)。最好现用现配。

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   |

7.3 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。

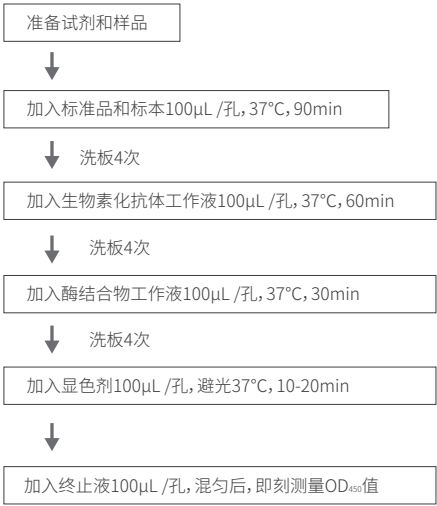
6.加入酶结合物工作液(100μL/孔)。用封板胶纸封住反应孔，37℃孵箱孵育30分钟(空白对照孔除外)。

7.洗板4次。

8.加入显色剂100μL/孔，避光，37℃孵箱孵育10-20分钟。

9.加入终止液100μL/孔，混匀后即刻测量OD<sub>450</sub>值(5分钟内)。

7.4 操作流程图



7.5 操作要点提示

- 1、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。
- 2、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。
- 3、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。
- 4、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。
- 5、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。

7.6 结果判断

- 1、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。
- 2、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。
- 3、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。
- 4、参考数据：

| 标准品浓度(pg/mL) | OD值1  | OD值2  | 平均值   | 矫正值   |
|--------------|-------|-------|-------|-------|
| 0            | 0.019 | 0.032 | 0.026 | —     |
| 234          | 0.104 | 0.110 | 0.107 | 0.081 |
| 468.75       | 0.168 | 0.162 | 0.165 | 0.139 |
| 937.5        | 0.307 | 0.305 | 0.306 | 0.280 |
| 1875         | 0.568 | 0.570 | 0.569 | 0.543 |
| 3750         | 1.022 | 1.012 | 1.017 | 0.991 |
| 7500         | 1.777 | 1.769 | 1.773 | 1.747 |
| 15000        | 2.415 | 2.410 | 2.412 | 2.386 |



八、常见问题分析及解决

| 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。                                   |
|                             | 漏加酶                                   | 检查操作流程, 注意不要漏加                                                                     |
|                             | HRP酶污染了叠氮钠                            | 使用新配制的试剂, 禁叠氮钠                                                                     |
| 显色弱                         | 试剂配制/使用有误                             | 重做试验, 严格按照说明书操作, 每次配制和使用前看清标签                                                      |
|                             | 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                                                                            |
|                             | 缩短孵育时间能使实验信号变弱                        | 检查孵育时间                                                                             |
|                             | 使用了被污染的试剂                             | 检查试剂是否被污染                                                                          |
|                             | 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                                                                  |
|                             | 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                                                         |
|                             |                                       | 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                                                  |
|                             |                                       | 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                                       |
| 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                                                               |
|                             | 酶加量过多                                 | 加酶前验看移液器调节量是否准确                                                                    |
|                             |                                       | 检查稀释度, 若必要进行效价测定                                                                   |
| 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                                                |
|                             | 太多的酶结合物                               | 检查稀释度, 必要时进行效价测定                                                                   |
|                             | 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                                                                |
| 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                                                               |
|                             | 出现干板, 没有使用封板膜、封板膜重复使用                 | 确定每两步骤间酶标板应保持湿润<br>使用封板膜封口, 注意每步使用新鲜的封板膜                                           |
|                             | 移液器不准确, 吸头重复使用                        | 检查并校准移液器, 每次取样必须更换吸头                                                               |
|                             | 酶结合物不足                                | 检查稀释度, 必要时进行效价测定                                                                   |
| 标准曲线可得到, 但两点之间区别很差 (低或平的曲线) | 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                                | 延长底物孵育时间                                                                           |
|                             |                                       | 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                          | 使用内参对照                                                                             |
|                             | 标本基质遮盖检测                              | 重复实验, 重新考虑实验的相应参数                                                                  |
|                             |                                       | 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                                                                               |
| 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                                                                    |
| 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。 |
|                             |                                       |                                                                                    |

实际加样情况表

|   |   |   |   |   |   |   |   |   |    |    |    |
|---|---|---|---|---|---|---|---|---|----|----|----|
| 1 | 2 | 3 | 4 | 5 | 6 | 7 | 8 | 9 | 10 | 11 | 12 |
|   |   |   |   |   |   |   |   |   |    |    |    |
|   |   |   |   |   |   |   |   |   |    |    |    |
|   |   |   |   |   |   |   |   |   |    |    |    |
|   |   |   |   |   |   |   |   |   |    |    |    |
|   |   |   |   |   |   |   |   |   |    |    |    |
|   |   |   |   |   |   |   |   |   |    |    |    |
|   |   |   |   |   |   |   |   |   |    |    |    |
|   |   |   |   |   |   |   |   |   |    |    |    |
|   |   |   |   |   |   |   |   |   |    |    |    |
|   |   |   |   |   |   |   |   |   |    |    |    |
|   |   |   |   |   |   |   |   |   |    |    |    |