

# 人维生素D结合蛋白酶联免疫吸附测定试剂盒

Human Vitamin D BP ELISA Kit

本产品需冰袋运输。保存于4℃，保质期6个月；保存于-20℃，保质期12个月。

## 产品参数

|      |                       |
|------|-----------------------|
| 货号   | HJ427                 |
| 规格   | 96 次                  |
| 检测范围 | 0.156 ng/mL~10 ng/mL  |
| 敏感性  | 28 pg/mL              |
| 特异性  | 系统和其它因子无交叉反应          |
| 样本类型 | 人血清、血浆、体液、组织匀浆或细胞培养上清 |

## 产品简介

本试剂盒采用双抗体夹心 ELISA 法检测样品中人 DBP 的浓度。人 DBP 捕获抗体已经预包被于酶标板上,当加入样品或标准品时,其中的人 DBP 会与捕获抗体结合,而其它游离成分则会通过洗涤被除去。接着,再加入生物素标记的人 DBP 抗体后,抗人 DBP 抗体与人 DBP 接合,形成夹心的免疫复合物,其它游离成分则通过洗涤被除去。随后加入酶复合物,生物素与酶复合物特异性结合,这样酶复合物上的 HRP 就与夹心的免疫复合物连接起来,而其它游离成分则通过洗涤被除去。最后加入显色剂,若样品中存在人 DBP,则会形成免疫复合物,其上连接的 HRP 会催化无色的显色剂氧化生成蓝色物质,而后加入终止液,最终产物呈黄色。通过酶标仪检测,读取 450 nm 处的 OD 值,人 DBP 浓度与 OD450 值之间呈正比,通过检测标准品绘制标准曲线,对照未知样品中 OD 值,即可计算出样品中人 DBP 的浓度。

## 背景简介

维生素 D 结合蛋白(Vitamin D Binding Protein, 或 Vitamin D BP, 简称 DBP), 是一种由肝脏合成的蛋白质,广泛分布于全身多个组织和器官中。

DBP 的主要功能包括: 维生素 D 的转运和免疫调节功能。DBP 在血液循环中结合、溶解和转运维生素 D 及其代谢产物。DBP 具有独立于维生素 D 转运之外的免疫调节功能, 与炎症和肿瘤的发生发展存在一定的关系。

## 产品内容

| 组分                   | 体积或数量                  |
|----------------------|------------------------|
| 人 DBP 预包被板           | 8 孔条 ×12 个             |
| 样品稀释液                | 30 mL                  |
| 重组人 DBP 标准品 (冻干)     | 2 支 (10 ng/ 支)         |
| 生物素标记人 DBP 抗体        | 130 $\mu$ L (效价 1:100) |
| 抗体稀释液                | 12 mL                  |
| 酶复合物 (HRP 标记的链霉亲和素)  | 130 $\mu$ L (效价 1:100) |
| 酶复合物稀释液              | 12 mL                  |
| 浓缩洗涤液 (25 $\times$ ) | 30 mL                  |
| 显色剂 TMB              | 10 mL                  |
| 终止液                  | 10 mL                  |
| 封板胶纸                 | 4 张                    |

## 操作步骤

### 样品制备

#### 1. 根据样品种类选择相应的处理方法：

- 细胞上清：**将细胞培养上清液 100~500 $\times g$  离心 5 min, 去除悬浮物后即可；
- 血清样品：**将全血在室温下静置 0.5~2 h, 待其自然凝固并析出血清后, 离心取黄色上清即可 (4 $^{\circ}$ C, 1,000~2,000 $\times g$ , 10 min), 注意请勿吸取沉淀, 制备好的血清需置于冰上待用, 请勿在其中添加任何防腐剂或抗凝剂；
- 血浆样品：**使用 EDTA 对全血进行抗凝处理后, 混合均匀置于冰上, 离心取黄色上清即可 (4 $^{\circ}$ C, 1,000~2,000 $\times g$ , 10 min), 注意请勿吸取沉淀, 制备好的血浆需置于冰上待用；
- 组织匀浆/体液：**离心去除沉淀即可。

注意：① 若待测样品无法及时检测，样品制备完成后，请分装冻存于-20 $^{\circ}$ C，避免反复冻融；  
② 请保证待测样品清澈透明，检测前如发现样品中有悬浮物，需通过离心去除；  
③ 为了保证检测结果准确，请勿使用溶血、黄疸、高血脂或污染的样品。

#### 2. 稀释样品

查阅相关文献, 预估样品中待测因子的含量, 从而确定适当的稀释倍数, 使稀释后样品中待测因子的浓度处于 ELISA 试剂盒的最佳检测范围。根据待测因子含量的不同, 分别采取不同的稀释方案：

- 待测因子含量在 100~1,000 ng/mL 范围内, 一般按 1:100 稀释, 即向 297  $\mu$ L 样品稀释液中加入 3  $\mu$ L 样品；
- 待测因子含量在 10~100 ng/mL 范围内, 一般按 1:10 稀释, 即向 225  $\mu$ L 样品稀释液中加入 25  $\mu$ L 样品；
- 待测因子含量在 0.156~10 ng/mL 范围内, 一般按 1:2 稀释, 即向 100  $\mu$ L 样品稀释液中加入 100  $\mu$ L 样品；
- 待测因子含量 $\leq$ 0.156 ng/mL, 样品一般无需稀释。

以上方案仅供参考, 实验中请详细记录样品的稀释方法。



### 检测准备工作

3. 试剂盒自 4℃冰箱取出后,请置于室温平衡 20 min; 如从 -20℃取出,各组分需彻底融化后再平衡 20 min; 检测完成后,剩余试剂请及时置于 4℃或 -20℃保存;
4. 将 **浓缩洗涤液(25×)** 用双蒸水或去离子水稀释成 1×洗涤液;
5. 重组人 DBP 标准品的稀释和使用 (在使用前 2 h 内准备,室温操作,请严格控制在 25~28℃)
  - ① 配制 10 ng/mL 标准品: 取 1 mL 样品稀释液加入标准品管内,盖好后静置 15 min 以上,然后反复颠倒 / 搓动以助溶解;
  - ② 按下表将 10 ng/mL 标准品用样品稀释液进行倍比梯度稀释。(最高浓度为 10 ng/mL,将标准品稀释液作为浓度 0 ng/mL。)

| 管号 | 稀释液用量(μL) | 复溶后标准品用量(μL) | 标准品的最终浓度(ng/mL) |
|----|-----------|--------------|-----------------|
| A  | 0         | 1,000        | 10              |
| B  | 300       | 300(从A管中取)   | 5               |
| C  | 300       | 300(从B管中取)   | 2.5             |
| D  | 300       | 300(从C管中取)   | 1.25            |
| E  | 300       | 300(从D管中取)   | 0.625           |
| F  | 300       | 300(从E管中取)   | 0.312           |
| G  | 300       | 300(从F管中取)   | 0.156           |
| H  | 300       | 0            | 0               |

注意: 标准品复溶加样后, 剩余部分请丢弃。

6. 准备生物素标记人 DBP 抗体工作液
  - ① 按每孔需添加 100 μL 抗体工作液, 计算其总用量 (为弥补操作中的损耗, 需多配制 100~200 μL);
  - ② 按 1 μL 生物素标记人 DBP 抗体 添加 99 μL 抗体稀释液 的比例配制工作液, 轻轻混匀。
7. 准备酶复合物工作液 (需在使用前 1 h 内准备)
  - ① 按每孔需添加 100 μL 酶复合物工作液, 计算其总用量 (为弥补操作中的损耗, 需多配制 100~200 μL);
  - ② 按 1 μL 酶复合物 添加 99 μL 酶复合物稀释液 的比例配制工作液, 轻轻混匀。

### 检测流程

8. 通过计算确定一次实验所需的板条数, 取出所需板条放置于框架内, 多余的板条请放回铝箔袋密封, 保存于 4℃或 -20℃;  
注意: ① 标准品和样品建议做双复孔检测;  
② 每次实验均需绘制标准曲线。
9. 将用样品稀释液稀释后的样品和不同浓度标准品 (100 μL/ 孔) 分别加入相应孔中, 用封板胶纸封住反应孔, 37℃孵育 90 min;  
注意: ① 请查阅相关文献确定样品中待检测蛋白的大致浓度, 若其大于本试剂盒标准曲线的最大标准品浓度, 请将样品适当稀释后再进行检测;  
② 整个加样过程不宜超过 10 min, 否则可能会影响检测结果。
10. 甩去酶标板内液体, 无需洗板, 将板倒扣在吸水纸上拍干;
11. 加入稀释后的生物素标记人 DBP 抗体工作液 (100 μL/ 孔), 用封板胶纸封住反应孔, 37℃孵育 60 min;

12. 洗板 5 次, 每孔 1× 洗涤液用量为 300  $\mu\text{L}$ , 注入与吸出间隔 15~30 s, 洗完后将板倒扣在吸水纸上拍干;  
注意: 洗涤过程至关重要, 洗涤不充分会导致结果产生较大误差。
13. 加入稀释后的酶复合物 (100  $\mu\text{L}$ / 孔 ), 用封板胶纸封住反应孔, 37°C 避光孵育 30 min;
14. 洗板 5 次, 方法同步骤 12;
15. 加入 显色剂 TMB (100  $\mu\text{L}$ / 孔 ), 用封板胶纸封住反应孔, 避光 37°C 反应 10~25 min;  
注意: ① 在保存和使用时, 请勿将 TMB 接触氧化剂和金属;  
② 因实验室条件差异, 最佳显色时间会有所不同, 反应充分时肉眼可见标准品的前 3~4 孔有明显的梯度蓝色。
16. 加入 终止液 (100  $\mu\text{L}$ / 孔 ), 混匀后即刻使用酶标仪测量 OD450, 同时设定 540 nm 或 570 nm 作为校正波长, 即可计算得到校正吸光度值 (OD450-OD540 或 OD450-OD570);  
注意: 读取 OD 值建议在 10 min 内完成。

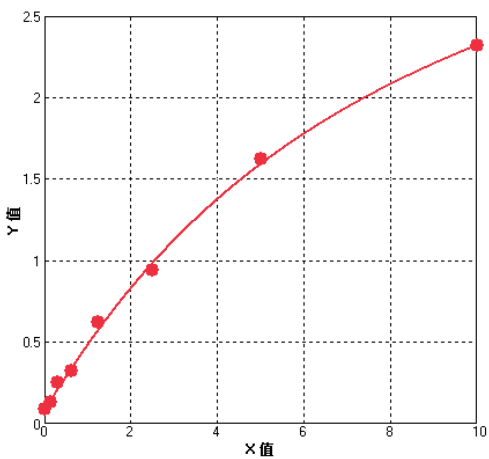
### 数据分析

17. 绘制标准曲线。以标准品浓度作横坐标, OD 值作纵坐标, 利用计算机软件作四参数逻辑 (4-PL) 曲线拟合创建标准曲线, 通过样品的 OD 值即可在标准曲线上计算出其相应浓度。  
注意: ① 复孔 OD 值在 20% 的差异范围内结果才有效, 复孔 OD 值取平均后可作为测量值;  
② 若样品 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。

### 标准曲线范例

人 DBP 参考标准曲线

| 标准品浓度       | O.D.  |
|-------------|-------|
| 0 ng/mL     | 0.092 |
| 0.156 ng/mL | 0.129 |
| 0.312 ng/mL | 0.254 |
| 0.625 ng/mL | 0.323 |
| 1.25 ng/mL  | 0.618 |
| 2.5 ng/mL   | 0.944 |
| 5 ng/mL     | 1.624 |
| 10 ng/mL    | 2.317 |



注意: 本图仅供参考, 应以同次试验标准品所绘标准曲线计算样品含量。

### 注意事项

1. 浓缩洗涤液 低温情况下可能会出现结晶, 请水浴加热使结晶完全溶解后再配制工作液;
2. 严禁混用不同批号试剂盒的组分;
3. 加样过程请避免产生气泡, 实验操作过程中一定要保证试剂充分混匀, 否则会使结果产生较大误差;
4. 说明书中提到的室温条件, 请严格控制在 25~28°C;
5. 为了您的安全和健康, 请穿实验服并戴一次性手套操作;
6. 本产品仅限科研使用。