货号 ENMK06212

Human 25(OH)D3, ALP, ASMA, BALP 多因子 ELISA 试剂盒

检测指标	检测范围	灵敏度	检测时长
25(OH)D3	0.78-50 ng/mL	0.26 ng/mL	4 小时
ALP	0.156-10 ng/mL	0.052 ng/mL	4 小时
ASMA	0.5-32 ng/mL	0.167 ng/mL	4 小时
BALP	0.156-10 ng/mL	0.052 ng/mL	4 小时
检测指标	**板内精密度**	**板间精密度**	**回收率范围**
25(OH)D3	CV ≤ 6%	CV ≤ 10%	77-113%
ALP	CV ≤ 6%	CV ≤ 11%	77-96%
ASMA	CV ≤ 6%	CV ≤ 9%	77-96%
BALP	CV ≤ 7%	CV ≤ 11%	75-102%

规格	详情
样本类型及每孔所需体积	血清（100 μL）、血浆（100 μL）、细胞培养上清液（100 μL）、尿液（100 μL）等
储存条件	-20℃（长期）；短期可 2-8℃保存，最长 2 周
用途	用于样本中 25(OH)D3、ALP、ASMA、BALP 的体外定量检测
规格	96T
生产日期	标注于外包装
保质期	-20℃保存 12 个月

本试剂盒用于血清、血浆、细胞培养上清液和组织匀浆样本中四种目标分析物的体外定量检测。如需检测其他特殊样本类型，请联系我们的技术支持团队。本试剂盒仅限研究使用（RUO）。使用前请仔细阅读说明书，并确认试剂盒所有组件完整无缺。

本试剂盒采用"双抗体夹心法"技术。双抗体夹心法的原理基于目标分析物至少具有两个不同表位的特点，可同时被预包被的捕获抗体和检测抗体识别。操作步骤如下：

1. 用捕获抗体包被微孔板，洗涤去除未结合的抗体和杂质。用无关蛋白封闭板上剩余的结合位点。
2. 封闭剩余结合位点后，加入含目标分析物的样本。目标分析物被特异性捕获抗体固定，形成抗原-抗体复合物。洗涤微孔去除未结合的颗粒和杂质。
3. 向微孔中加入针对四种目标分析物的生物素标记检测抗体，形成抗体-抗原-抗体复合物。再次洗涤微孔板以去除未结合的抗体和杂质。
4. 随后向微孔中加入辣根过氧化物酶-亲和素结合物（HRP-亲和素），与生物素标记抗体结合。报告酶的量与样本中目标分析物的量呈正相关。再次洗涤微孔以去除残留杂质。

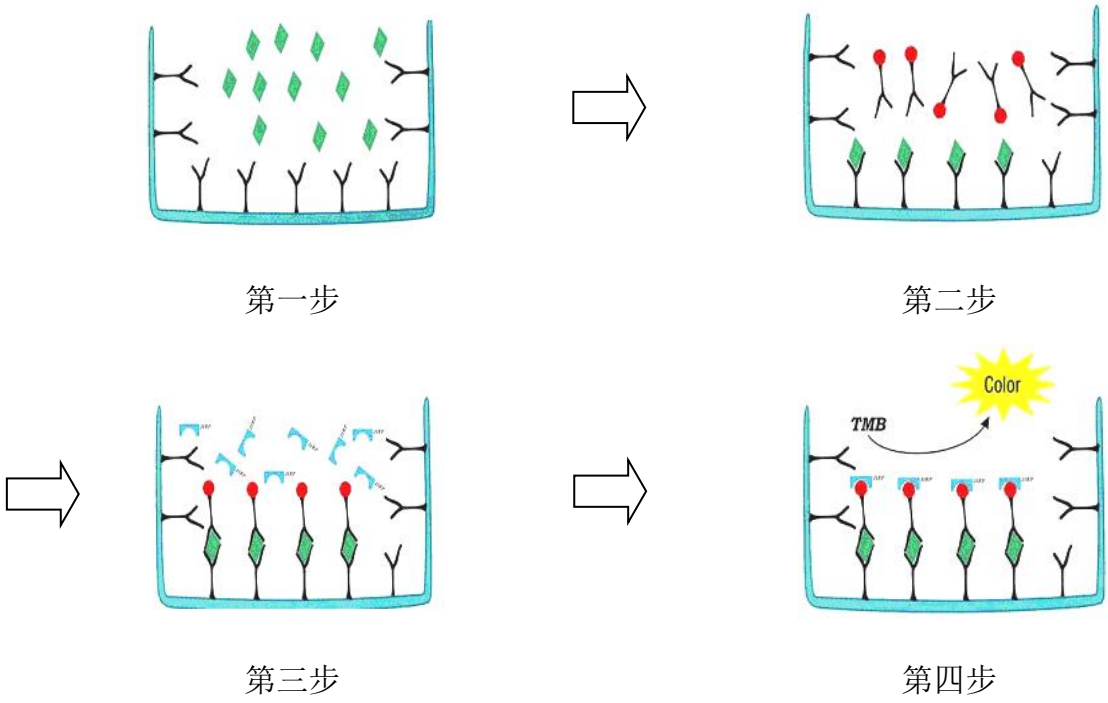
For research use only. Not for use in diagnostic procedures.

5. 最后加入辣根过氧化物酶（HRP）的底物，根据产生的颜色变化计算样本浓度。

注意：抗体可标记多个生物素基团，每个生物素均可与 HRP-亲和素结合，从而使每个抗体结合多个 HRP 复合物。与传统直接 HRP 标记抗体相比，该方法具有更高的灵敏度和更强的信号放大效果。

本试剂盒采用双抗体夹心 ELISA 技术。预包被微孔板分别包被抗 25(OH)D3、ALP、ASMA 和 BALP 的单克隆抗体，检测试剂为针对四种分析物的混合生物素标记多克隆抗体。将样本和生物素标记抗体加入微孔板微孔中，每次孵育后用 PBS 或 TBS 洗涤缓冲液洗涤。随后向微孔中加入亲和素-过氧化物酶结合物。用 PBS 或 TBS 彻底洗去未结合的酶结合物后，加入 TMB 底物显色。TMB 被过氧化物酶氧化产生蓝色产物，加入终止液（显色剂 C）后溶液变为黄色。颜色强度与样本中目标分析物的浓度呈正相关。

双抗体夹心法原理示意图：



第一步　　第二步

第三步　　第四步

试剂盒组成

名称	96 孔	48 孔	储存条件
25(OH)D3(1-3)、ALP(4-6)、ASMA(7-9)、BALP(10-12)预包被板	8×12	8×6	2-8℃或-20℃
25(OH)D3、ALP、ASMA、BALP 预混标准品	2 支	1 支	2-8℃或-20℃
生物素标记 25(OH)D3、ALP、ASMA、BALP 预混抗体（1:100）	1 支	1 支	2-8℃或-20℃

For research use only. Not for use in diagnostic procedures.

酶结合物（1:100）	1 支	1 支	2-8℃或-20℃
25(OH)D3、ALP、ASMA、BALP 标准品稀释液	1 支	1 支	2-8℃或-20℃
25(OH)D3、ALP、ASMA、BALP 抗体稀释液	1 支	1 支	2-8℃或-20℃
酶稀释液	1 支	1 支	2-8℃或-20℃
样本稀释液	1 支	1 支	2-8℃或-20℃
洗涤缓冲液（1:25）	1 支	1 支	2-8℃或-20℃
显色剂 A	1 支	1 支	2-8℃或-20℃
显色剂 B	1 支	1 支	2-8℃或-20℃
显色剂 C	1 支	1 支	2-8℃或-20℃
说明书	1 套	1 套	室温

注释：

RT：室温

标准品：冻干

显色剂 A：避光保存

需要但未随试剂盒提供的材料

1. 酶标仪（配备 450 nm 检测波长滤光片；建议使用 630 nm 校正波长滤光片）
2. 洗板机（可调节加液量，确保每孔加入 350 μL 且不溢出）
3. 超净台、生物安全柜、通风橱
4. 高精度单通道移液器（量程：0.5-10 μL、20-200 μL、200-1000 μL）
5. 高精度多通道移液器（8 道或 12 道，量程：50-300 μL）
6. 37℃恒温培养箱
7. 冷藏离心机
8. 冰箱（能维持 4℃、-20℃和-86℃温度）
9. 分析天平
10. 剪刀、镊子、钳子等
11. 摇床、低频振荡器等

其他需要自备的材料

1. 离心管（容量：1.5 mL、5 mL 等）
2. 一次性移液器吸头（量程：0.5-10 μL、20-200 μL、200-1000 μL）
3. 纯水或蒸馏水
4. 半对数坐标纸
5. 吸水纸

6. EDTA、柠檬酸钠和肝素

样本采集注意事项

1. 采血管应无热原且无内毒素。
2. 不建议使用溶血或高血脂样本。
3. 样本应澄清透明；所有颗粒物必须通过离心去除。
4. 如采集的样本不能立即使用，应分装为单次使用量，冷冻保存于-20℃至-80℃。避免反复冻融。
5. 通常需要优化样本稀释比例，以确保样本浓度落在标准曲线的线性范围内。建议在对大批量样本进行检测前先进行预实验，确定最佳稀释比例。
6. 建议收集足够的样本量用于重复检测，以防意外情况导致数据丢失。
7. 采集或处理样本时始终穿戴防护装备（如手套、实验服、呼吸器等），并注意标本处理相关的所有潜在风险。
8. 标本处理应在维护良好的生物安全柜中进行。

样本制备

血清：将采集的全血置于 4℃冰箱过夜。然后以 1000-3000 rpm 离心 10 分钟。收集上清液，立即检测或保存于-20℃或-80℃冷冻 1-3 个月。

血浆：使用 EDTA、柠檬酸钠或肝素作为抗凝剂。将所选抗凝剂加入采集的全血中，充分混匀，然后分离血浆。以 1000-3000 rpm 离心血浆混合物 10 分钟。收集上清液，立即检测或保存于-20℃或-80℃冷冻 1-3 个月。

组织匀浆：取组织切片，用 0.01 M PBS 冲洗。按 1 g 组织加 5-10 mL 试剂的比例加入组织蛋白提取试剂，在冰浴中充分混匀。充分匀浆后，以 5000-10000 rpm 离心 10 分钟。收集上清液立即检测，或保存于-20℃或-80℃冷冻 1-3 个月。

细胞培养上清液：将采集的细胞培养上清液以 1000-3000 rpm 离心 10 分钟。收集上清液立即检测，或保存于-20℃或-80℃冷冻 1-3 个月。

特殊样本（尿液、腹水、脑脊液等）：将样本以 1000-3000 rpm 离心 10 分钟。收集上清液立即检测，或保存于-20℃或-80℃冷冻 1-3 个月。

注意：建议用户了解样本的预期浓度范围。建议查阅相关文献中类似样本的浓度范围，然后相应调整样本稀释比例。

注意

1. 复溶后的标准品不可储存；标准品复溶后不得再次冻融。
2. 由于运输过程中的震动或倒置，可能需要离心试剂盒管或瓶子以将所有内容物收集到底部。应手动涡旋振荡或用 1000 rpm 离心 1 分钟。
3. 浓缩洗涤缓冲液可能略有结晶。可将缓冲液在水浴中加热以促进稀释时的溶解。使用前必

须确保晶体完全溶解。

4. 配制好的标准品仅限单次使用；已检测过的标准品不得重复使用。如需重复检测，请使用提供的第二支标准品。
5. 仅使用本试剂盒提供的试剂和组件。不要混合不同批次或不同型号的试剂盒组件。
6. 确保所有试剂充分混匀。对于加入微孔板的试剂，充分混匀对获得准确的检测结果至关重要。建议使用微孔板摇床（设置最低频率）。如无摇床，可手动轻轻画圈摇动微孔板 1 分钟以确保各孔混合均匀。
7. 开始检测前，将试剂盒平衡至室温。
8. 建议所有标准品做双份或三份重复。
9. 短期不用的微孔板条请保存在原铝箔袋中，2-8℃保存。
10. 显色剂对光敏感；请避光保存。
11. 请勿使用过期的试剂盒。
12. 使用双波长检测时，设置波长为 450 nm 和 630 nm。
13. 所有样本、洗涤缓冲液和废弃物均应作为生物危害废物处理。显色剂 C 为 1 M 硫酸；请极其谨慎地处理该试剂。
14. 加样必须使用移液器或类似校准过的仪器进行。检测前校准仪器以避免实验误差。快速将样本加入微孔中，控制总加样时间在 5 分钟以内。建议使用多通道移液器以减少加样时间。
15. 请勿重复使用封板膜。如仅使用部分板条，请将封板膜裁剪至合适大小，使用后丢弃。
16. 每次独立检测必须重新绘制标准曲线。如果样本的检测浓度过高（即 OD 值高于最高浓度标准孔），请将样本稀释特定倍数后重新检测，并在最终计算时乘以稀释倍数。
17. 含叠氮钠（NaN_3 ）的样本不能进行检测，因为 NaN_3 会抑制辣根过氧化物酶（HRP）的酶活性。
18. 使用洗板机时，确保每孔缓冲液量略多于 350 μL，并检查移液探针是否堵塞。如手动洗涤，用吸水纸吸去多余缓冲液，并确保吸水纸未与其他试剂接触以防止交叉污染。
19. 加入显色剂 C 终止显色反应后，10 分钟内读取 OD 值。
20. 对于做双份检测的样本，使用双孔的平均 OD 值进行计算。
21. 溶血样本可能导致假阳性结果，不适用于本试剂盒。
22. 检测过程中保持相对湿度约 60%。
23. 定期验证培养箱的校准，确保稳定的 37℃孵育温度。
24. 对于 48 孔 ELISA 试剂盒，所有组件的用量为 96 孔试剂盒的 50%。

检测准备

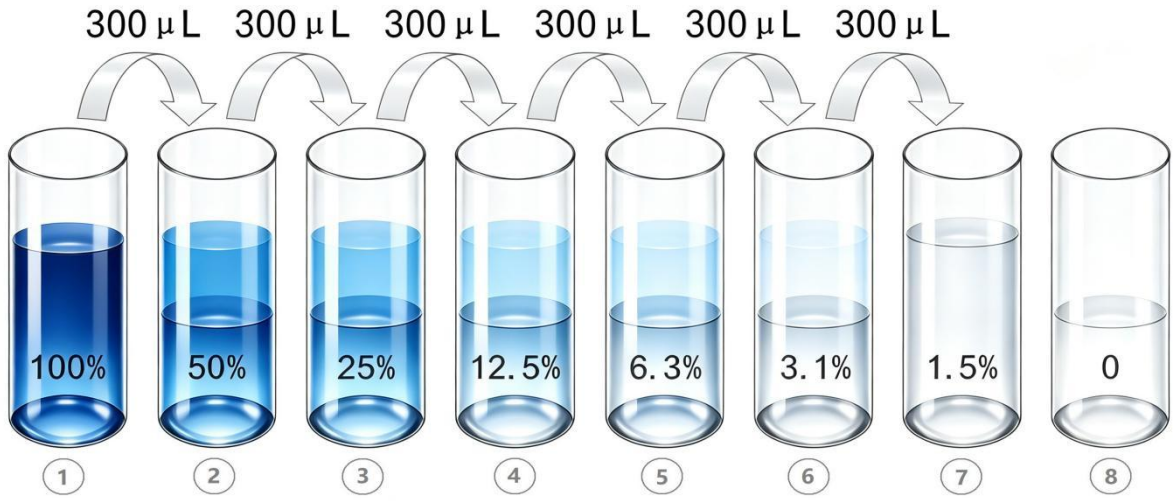
1. 提前 20 分钟从冰箱中取出 ELISA 试剂盒，平衡至室温后开始检测。

For research use only. Not for use in diagnostic procedures.

2. 用双蒸水将浓缩洗涤缓冲液按 1:25 比例稀释。未使用的部分放回原试剂盒盒中保存。
3. 标准品配制：向冻干标准品管中加入 1.0 mL 标准品稀释液，静置 30 分钟。标准品完全溶解后，轻轻颠倒混匀数次，并明确标记为 STD1。注意：确保冻干标准品完全溶解并充分混匀。
4. 标准品稀释操作：取 7 支干净试管，标记预期浓度（STD2、STD3、STD4、STD5、STD6、STD7、STD8）。每管加入 300 μL 标准品稀释液。从复溶的 STD1 中吸取 300 μL 加入标记为 STD2 的试管中混匀。然后从 STD2 管中吸取 300 μL 加入 STD3 管中混匀。依次类推至 STD7 管。STD8 管中的标准品稀释液作为阴性对照。

靶标	STD1	STD2	STD3	STD4	STD5	STD6	STD7	STD8	浓度
25(OH)D3	50	25	12.5	6.25	3.125	1.563	0.781	0	ng/mL
ALP	10	5	2.5	1.25	0.625	0.313	0.156	0	ng/mL
ASMA	32	16	8	4	2	1	0.5	0	ng/mL
BALP	10	5	2.5	1.25	0.625	0.313	0.156	0	ng/mL

注意：复溶的标准品溶液（STD1：25(OH)D3 50 ng/mL、ALP 10 ng/mL、ASMA 32 ng/mL、BALP 10 ng/mL）检测完成后应丢弃，不可重复使用。



注意：复溶的标准品原液不可重复使用。

5. 生物素标记抗体：根据检测孔数吸取适量生物素标记抗体溶液，用抗体稀释液按 1:100 比例稀释。稀释后充分混匀。提前 30 分钟配制此工作液，稀释后的溶液不可用于后续检测。
6. 酶结合物：根据检测孔数吸取适量酶结合物溶液，用酶稀释液按 1:100 比例稀释。稀释后充分混匀。提前 30 分钟配制此工作液，稀释后的溶液不可用于后续检测。
7. 显色剂：将显色剂 A 和显色剂 B 按 9:1 比例混合，提前 30 分钟配制显色剂工作液。

洗涤方法

1. 自动洗板：每孔使用 350 μL 洗涤缓冲液，注液和吸液间隔 20-30 秒。使用前请熟悉仪器

For research use only. Not for use in diagnostic procedures.

操作手册。

2. 手动洗板：每孔加入 350 μL 洗涤缓冲液，静置 30 秒。剧烈振荡微孔板以尽可能去除液体，必要时在吸水纸上用力拍干。洗涤过程中注意加液步骤，避免交叉污染和漏洗。

操作步骤

1. 取出所需数量的微孔板条，平衡至室温。未使用的板条和干燥剂放回原密封铝箔袋中，2-8℃保存。
2. 预留空白孔（如使用双波长检测可省略空白孔）。
3. 向对应微孔中加入标准品或样本（每孔 100 μL）。注意 0 ng/mL 标准品孔应加入 100 μL 标准品稀释液。用封板膜封板，37℃孵育 90 分钟（避光）。
4. 提前 30 分钟配制所需量的生物素标记抗体。
5. 用提供的洗涤缓冲液洗涤 ELISA 板 2 次。
6. 向每孔加入配制好的生物素标记抗体（每孔 100 μL）。用封板膜封板，37℃孵育 60 分钟（避光）。
7. 提前 30 分钟配制所需量的酶结合物。
8. 用提供的洗涤缓冲液洗涤 ELISA 板 3 次。
9. 向除空白孔外的所有微孔中加入配制好的酶结合物（每孔 100 μL）。用封板膜封板，37℃孵育 30 分钟（避光）。
10. 用提供的洗涤缓冲液洗涤 ELISA 板 5 次。
11. 向每孔（包括空白孔）加入 100 μL 配制好的 TMB 底物溶液。37℃避光孵育 10-30 分钟。当最高浓度标准品孔出现明显显色且可见清晰颜色梯度时终止反应（显色反应时间不超过 30 分钟）。
12. 向每孔（包括空白孔）加入 100 μL 显色剂 C，充分混匀。10 分钟内以 450 nm 波长（或双波长检测 450 nm/630 nm）读取 OD 值。

结果判定

1. 每个样本和标准品的 OD 值应减去空白孔的 OD 值进行校正。

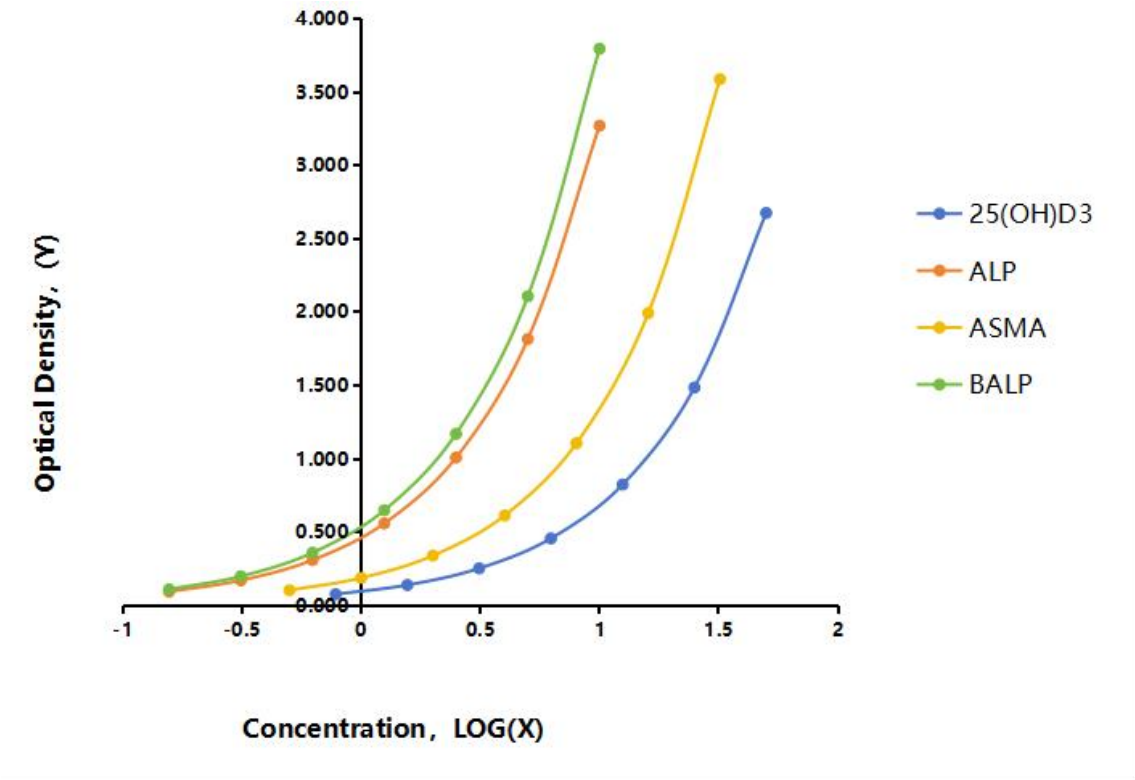
2. 手动绘制标准曲线：以标准品浓度为 X 轴，对应 OD 值为 Y 轴绘制标准曲线。将绘制点用平滑曲线连接。将样本 OD 值代入标准曲线方程计算样本浓度。建议使用专业曲线拟合软件（如 Curve Expert 1.3）进行结果分析和计算。

3. 如果样本 OD 值高于标准曲线中最高浓度标准品的 OD 值，应将样本稀释（或进一步稀释）后重新检测。计算最终浓度时将测得浓度乘以稀释倍数。

4. 标准曲线也可用对数转换浓度绘制，或在半对数坐标系中绘制。注意：本方案仅供参考。测试样本的浓度计算必须以同次实验产生的标准曲线为准。

For research use only. Not for use in diagnostic procedures.

参考曲线



注意：再次提醒，本图表仅供参考，用户样本浓度应以同次检测、同块微孔板上产生的标准曲线为准。

操作流程汇总

步骤	操作流程汇总
1	配制试剂、样本和标准品。
2	将配制好的样本和标准品加入对应微孔并封板。37℃孵育 90 分钟。
3	洗板 2 次。加入生物素标记抗体溶液并封板。37℃孵育 60 分钟。
4	洗板 3 次。加入配制好的酶结合物工作液并封板。37℃孵育 30 分钟。
5	洗板 5 次。加入 TMB 底物溶液，37℃避光孵育 10-30 分钟直至出现清晰的颜色梯度。
6	每孔加入显色剂 C 终止反应。
7	加入显色剂 C 后 10 分钟内用酶标仪在 450 nm 波长下读取 OD 值。
8	计算测试样本的浓度。

For research use only. Not for use in diagnostic procedures.