

人胆固醇-25-羟化酶 (CH25H) ELISA Kit

Catalog Number: BSKH63253

本试剂盒用于定量检测人血清、血浆、组织匀浆和其他生物液体等样本中胆固醇-25-羟化酶 (CH25H)含量。**使用前请仔细阅读说明书并检查试剂组分**，如有任何疑问请与北京博奥森生物技术有限公司联系，公司将为您提供强有力的技术支持。

仅供研究，不用于临床诊断。

目录

检测原理.....	3
试剂盒组成.....	3
其它实验材料.....	3
注意事项.....	4
样本收集、处理及保存方法.....	4
试剂准备.....	5
操作步骤.....	5
结果判断.....	6
试剂盒性能.....	7
检测范围.....	7
灵敏度.....	7

检测原理:

本试剂盒采用 ELISA 双抗体夹心法原理。用纯化的胆固醇-25-羟化酶(CH25H)抗体包被微孔板, 向已包被的微孔板中依次加入标准品及待测样本, 待其与包被抗体充分结合后, 再与生物素化的 CH25H 抗体结合, 其后加入辣根过氧化物酶 (HRP) 标记的链霉亲和素, 生物素与链霉亲和素形成高强度的非共价结合, 经过彻底洗涤后加入底物 TMB 显色。TMB 在 HRP 酶的催化作用下转化成蓝色, 并在酸的作用下最终转化成黄色。颜色的深浅和样本中的 CH25H 含量呈正相关。用酶标仪在 450nm 波长下测定吸光值 (OD 值), 通过绘制标准曲线计算样本中 CH25H 浓度。

试剂盒组成:

试剂盒组成	规格 (96T)	保存条件
抗体包被板条	8×12	-20℃ 保存
标准品	2 瓶	-20℃ 保存
稀释液	45ml×1 瓶	-20℃ 保存
检测溶液 A	120 μl×1 支	-20℃ 保存
检测溶液 B	120 μl×1 支	-20℃ 保存
浓缩洗涤液 (30×)	20ml×1 瓶	2-8℃ 保存
显色底物 (避光)	9ml×1 瓶	2-8℃ 保存
终止液	6ml×1 瓶	2-8℃ 保存
封板胶纸	4 张	
说明书	1 份	

其它实验材料 (不提供, 但可协助购买):

- 1.酶标仪(波长 450nm)
- 2.高精度可调移液器 (已校准) 及吸头: 0.5-10,2-20,20-200,200-1000μl。
一次检测样本较多时, 建议使用多通道移液器。
- 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

注意事项:

1.试剂盒保存在 4°C & -20°C，已复溶但未用完的标准品，建议丢弃。不可混合使用不同来源或不同批号的试剂盒组分，请在有效期内使用本产品。

2.浓缩洗涤液低温取出可能会伴有结晶析出，稀释时可在水浴中加热助溶，不影响使用。

3.各步加样均应使用移液器，并经过校准，以免产生误差。建议一次加样时间最好控制在 5 分钟内，如样本数量较多，推荐使用排枪加样。

4.请每次测定的同时做标准曲线，最好做复孔。如样本中待测物质含量高于试剂盒检测上限（样本 OD 值大于标准品孔第一孔的 OD 值），请先用样本稀释液稀释一定的倍数（n 倍）后再测定，计算时需乘以总稀释倍数。

5.为避免交叉污染，在加入不同浓度的标准品、不同样本、不同试剂时谨记及时更换吸头，封板胶纸只限一次性使用。

6.显色底物请避光保存。

7.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。

样本收集、处理及保存方法:

1.血清：室温血液自然凝固 60-120 分钟，1000g 离心 20 分钟，收集上清，若保存过程中出现沉淀，应再次离心，避免反复冻融。

2.血浆：根据样本的要求选择 EDTA 或柠檬酸作为抗凝剂，1000g 离心 20 分钟左右，收集上清，若保存过程中出现沉淀，应再次离心。

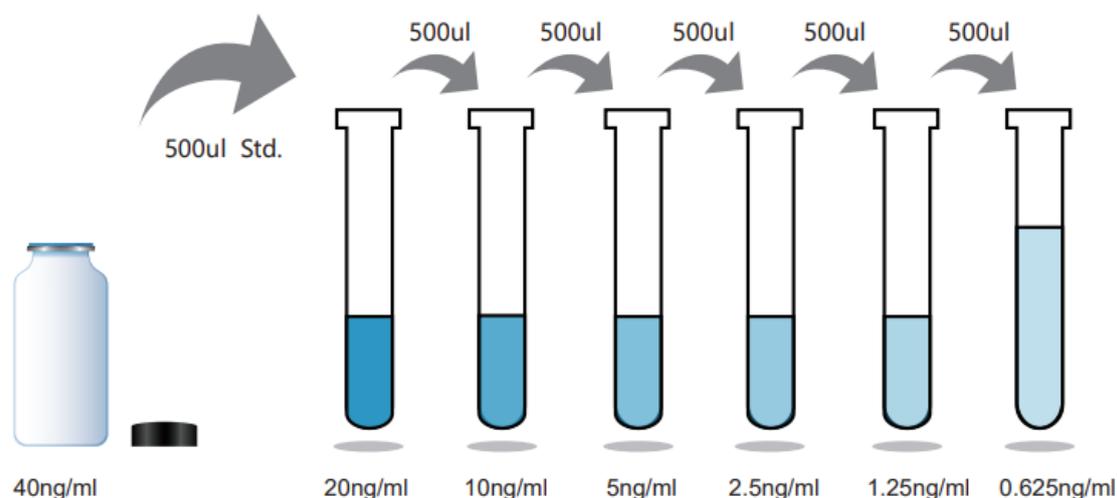
3.其它生物样本：检测分泌性的成分时，用无菌管收集，1000g 离心 20 分钟左右，收集上清。

4.组织匀浆：1) 取适量组织块，于预冷 PBS 中清洗去除血液，称重后备用（组织块较大需先剪碎后再匀浆）；2) 可同时选用多种匀浆方法达到较好的破碎效果：首先将组织块移入玻璃匀浆器，加入 5-10mL 预冷 PBS 进行充分研磨，该过程需在冰上进行；得到的匀浆液可再利用超声破碎或反复冻融进一步处理；3) 将制备好的匀浆液于 5000×g 离心 5 分钟，取上清即可。

5.若样本无法立即检测，请将其按最小使用量分装，-20°C —70°C 保存，避免反复冻融。尽量避免使用溶血或高血脂样本。

试剂准备:

- 1.试剂回温：请在实验前将试剂盒和待测样本置于室温下回温。
- 2.洗涤液配制：根据浓缩洗液的浓缩倍数，用双蒸水或去离子水进行相应倍数稀释后备用。
- 3.标准品梯度稀释：取 1ml 标准品/样本稀释液（S1）至冻干标准品中，静置 15 分钟待其完全溶解后轻轻混匀(浓度为 40ng/ml)，然后取 6 只聚丙烯试管，各加入 500 μ l 稀释液，按照以下浓度进行 2 倍稀释：20、10、5、2.5、1.25、0.625 ng/ml 进行稀释。40ng/ml 为标准曲线最高点浓度，稀释液作为标准曲线的零点（0ng/ml）。复溶过的标准品原液（40ng/ml）未用完的应废弃。



- 4.检测溶液A及检测溶液B：在使用前请手甩几下或少时离心处理，以使管壁或瓶盖的液体沉积到管底。临用前分别以稀释液 1:100稀释(如：10 μ L检测溶液A/990 μ L稀释液)，充分混匀，稀释前根据预先计算好的每次实验所需的总量配制(100 μ L/孔)，实际配制时应多配制 0.1-0.2mL。

操作步骤：

- 1.加样：根据试验所需用量，取出相应抗体包被板条，分别将已配制好的标准品、标准品零点及待测样本以 100 μ l/孔加入实验孔底部。
- 2.温育：用封板胶纸封板后置 37°C温育 120min。
- 3.弃去液体，甩干，不用洗涤。
- 4.加检测溶液 A 工作液（临用前配制）：每孔加入检测溶液 A 工作液 100 μ l。
- 5.温育：用封板胶纸封板后置 37°C温育 60 min。
- 6.洗涤：小心揭掉封板胶纸，弃去液体，甩干，每孔加满洗涤液（350 μ l），静置 1-2min 后弃去，如此重复 3 次，最后于吸水纸上拍干。
- 7.加检测溶液 B 工作液（临用前配制）：每孔加入检测溶液 B 工作液 100 μ l。
- 8.温育：用封板胶纸封板后置 37°C温育 60 min。

9.洗涤：同上述洗涤过程（步骤 5），洗板 5 次。

10.显色：每孔加入 90 μ l 显色底物溶液，用封板胶纸封板后 置 37 $^{\circ}$ C 显色 15-25min。

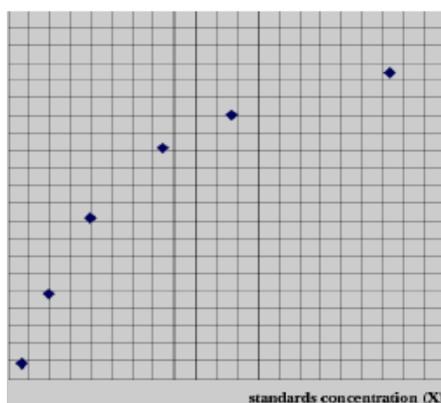
11.终止：每孔加终止液 50 μ l（此时蓝色立转黄色）。

12.测定：用酶标仪 450nm 波长测定各孔的吸光度（OD 值），测定应在加终止液后 5min 以内进行。

结果判定：

1.每个标准品和样本的 OD 值减去空白孔的 OD 值，为最终数值，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 CH25H 标准品浓度为横坐标(X)，生成相应的标准曲线，样本的 CH25H 含量可根据其 OD 值由标准曲线换算出相应的浓度。若样本 OD 值高于标准品曲线上限，请做适当倍数稀释，计算样本浓度时需乘以相应稀释倍数。



本图仅供参考，应以同次试验标准品所绘标准曲线为准

试剂盒性能：

批内与批间差应小于 10%

检测范围：

0.625 ng/ml -40 ng/ml

灵敏度：

0.252 ng/ml