

1, 25 双羟基维他命 D 检测试剂盒（酶联免疫法）使用说明书

货号：AC-62F1

【产品名称】

通用名称：1,25 双羟基维生素 D 检测试剂盒（酶联免疫法）

英文名称：1,25-Dihydroxy Vitamin D EIA

【包装规格】 96 人份/盒

【预期用途】

仅供体外诊断使用。IDS 公司的 1,25 双羟基维他命 D 检测试剂盒是一个通过免疫提取样本后进行酶联免疫测定人血清或血浆中的 1,25 双羟基维生素 D(1,25D)的纯化的完整检测系统。结果应结合其他临床和实验室数据用以协助临床医生对成人肾病患者体内的 1,25D 缺乏的评估。

【概要和说明】

维生素 D 是与来源于自然产生的 7-脱氢胆固醇(维生素 D₃ 前体)密切相关的分子的一个常见集体术语。在阳光照射下, 维生素 D₃ 前体在皮肤中经历光解转化生成维生素 D₃ (胆钙骨化醇)。这种化合物不具有生物活性, 但却进入血液循环中经肝脏羟化为活性 25 羟基维生素 D (25D), 少部分在肾脏中进一步羟化为高度活力的钙调节素 1,25D。

1,25D 在循环中主要与维生素 D 结合蛋白和白蛋白结合。

1,25D 是钙(和磷)代谢中的主要调节者之一, 刺激肠内钙吸收和促进骨重吸收。同时, 它通过直接作用于甲状旁腺和间接升高血钙水平来抑制甲状旁腺激素生成。1,25D 的生成本身也受到甲状旁腺激素的刺激, 因此形成一个有效的控制环。

维生素 D 缺乏症通常与饮食不足相关, 最常见的是素食主义者, 而且也与低阳光照射(如: 老年人和机构工作人员)和皮肤较黑有关。

在早期肾衰竭中 1,25D 的生成显示异常, 尽管这可能不会对肾脏产生影响。在晚期肾衰竭时, 1 α -羟基可能出现异常, 出现低 1,25D 水平结果。

【检验原理】

IDS 公司的 1, 25 双羟基维他命 D 检测试剂盒是通过免疫提取样本后进行酶联免疫测定病人样本中的 1, 25D 纯化的完整检测系统。病人样本脱酯, 通过与高特异的固相抗 1, 25D 单克隆抗体孵育 90 分钟后, 1, 25D 从潜在的交叉反应物中提取。免疫提取凝胶被冲洗, 纯化的 1,25D 直接进入玻璃管内。复溶的提取液和标准品与高度特异的羊抗 1,25D 孵育过夜。然后这一部分与包被有抗羊抗体的微孔中振荡孵育 90 分钟。1,25D 与后来加入的生物素联结并且在抽取和清洗之前微孔板继续振荡 60 分钟。标记抗生物素蛋白的酶(辣根过氧化物酶)加入并且选择性结合生物素, 跟着进一步的清洗, 加入底物显色。终止反应后在酶标仪处读取吸光度, 颜色强度与 1,25D 的浓度成反比。

【主要组成成份】

1. CAL | 0 - 6 - 标准品 0-6

(REF AC-6201A - AC-6201G):

冻干的 BSA 缓冲液包含 1,25 双羟基维生素 D 和 <0.4% 叠氮化钠 (0.01% 复溶后)。每个标准品的值已印在瓶子的标签上。每瓶 1 mL, 每盒 7 瓶。

2. Ab | 6x - 一抗浓缩液

(REF AC-6202):

含有羊抗 1,25 双羟基维生素 D 和 0.09% 叠氮化钠的 BSA 磷酸缓冲液。每瓶 2 mL。

3. Ab | BUF - 一抗缓冲液

(REF AC-6202B):

包含磷酸缓冲液和 0.09% 叠氮化钠。每瓶 10 mL。

4. Sac-Well™ | SHEEP - 抗羊微孔板

(REF AC-SH02W):

包被抗羊 IgG 抗体的微孔板, 12X8 板条, 包装于带有干燥剂的铝泊袋中。

5. 1,25D BIOTIN | 6x - 1,25D 生物素浓缩液

(REF AC-6203):

冻干的缓冲液包含生物素标记的1,25双羟维生素D和适量的稳定剂。每瓶2mL。

6. **1,25D BIOTIN | BUF** - 1,25D 生物素缓冲液

(REF AC-6203B):

含有0.09%叠氮化钠的磷酸盐缓冲液。每瓶12 mL。

7. **ENZYMCONJ** - 酶结合物

(REF AC-6204):

含有抗生物素蛋白连接到辣根过氧化物酶、蛋白、酶稳定剂和防腐剂的磷酸盐缓冲液。每瓶24mL。

8. **CTRL 1** - **CTRL 2** - 质控品1-2

(REF AC-6205A - AC-6205B):

含1,25双羟维生素D和<1% (0.09%复溶后) 叠氮化钠的冻干人血清。每瓶1.2 mL, 每盒2瓶。

9. **SORB** - 免疫提取管

(REF AC-6206):

提取管包含单克隆抗体1,25双羟维生素D连接到固相颗粒悬浮在维生素D结合蛋白抑制剂中。每盒80个免疫提取管。

10. **REAG | 1** - 脱脂试剂

(REF AC-6207):

右旋糖苷硫酸盐和氯化镁的溶液。每瓶2.5 mL。

11. **REAG | 2** - 洗脱试剂

(REF AC-6208):

乙醇。每瓶44 mL。

12. **BUF** - 分析缓冲液

(REF AC-6209):

含有0.09%叠氮化钠的BSA磷酸缓冲液。每瓶12 mL。

13. **TMB** - 底物

(REF AC-TMB):

含有四甲基联苯胺和过氧化氢。每瓶24 mL。

14. **HCL** - 终止液

(REF AC-STOP):

0.5M 盐酸。每瓶14 mL。

15. **WASHBUF | 20x** - 浓缩洗液

(REF AC-WASHL):

含有吐温的磷酸盐缓冲液。每瓶50 mL。

16. 封板膜

每盒8张。

17. 文件

说明书和质控报告单。

【储存条件及有效期】

试剂盒自生产之日起在 2-8°C 下可保存 12 个月。

试剂在 2-8°C 中保存可稳定到试剂包装上所示日期。

复溶的标准品、质控品和 1,25D 生物素溶液在 -20° C 可保存 8 周。

抗体溶液在 2-8° C 可保存 8 周。

未使用完的微孔板条应放回有干燥剂的铝箔袋中密封保存, 2-8°C 可保存 8 周。

应放在有干燥剂的密封袋中 2-8° C 保存稳定 8 星期。

洗液可在室温条件下保存 8 周。

【样本要求】

采用血清或血浆 (EDTA 或肝素) 样本。样本采集后应尽快分离。血清或血浆样本在 2-8°C 下可保存 2 天, -20°C 下可保存一个月, -80°C 可保存三年。避免样本反复冻融。整个实验应使用相同的样本类型。

【检验方法】

1. 自备材料

1) 12 x 75 mm 一次性硼硅酸盐玻璃试管。

2) 12 x 75 mm 一次性聚苯乙烯试管 (可选)。

- 3) 可移取 50 μ L, 100 μ L, 150 μ L, 200 μ L, 500 μ L 和 1mL的高精度移液器
- 4) 可移取150 μ L和500 μ L的多道移液器, 如Eppendorf 多道移液器4780或类似的。
- 5) 可移取100 μ L和200 μ L的高精度多道移液器
- 6) 旋涡混合器。
- 7) 完全颠倒混合器或滚筒式混合器。
- 8) 40 $^{\circ}$ C加热板或水浴箱
- 9) 氮气供给装置和氮吹仪
- 10) 可达2000g的离心机
- 11) 回转式振荡器
- 12) 自动洗板机 (可选)
- 13) 酶标仪和数据分析软件
- 14) 蒸馏水或去离子水

2. 试剂准备

- 1) **标准品**: 标准品以冻干品形式提供。使用前立即复溶。每瓶加1 mL蒸馏水或去离子水。盖紧瓶盖后在室温下放置5-10分钟, 期间反复颠倒几次确保完全复溶。不要使用旋转混合器复溶—这将降低效价。
- 2) **质控品**: 质控品以冻干品形式提供。使用前立即复溶。每瓶加1.2 mL蒸馏水或去离子水, 盖紧瓶盖后在室温下放置15-20分钟, 期间反复颠倒几次确保完全复溶。
如果标准品或质控品使用超过一次, 复溶后的15分钟内要冰冻保存(-20 $^{\circ}$ C)。当再使用时须平衡至室温, 混匀后15分钟内使用。
- 3) **一抗溶液**: 一抗浓缩液作为浓缩液提供, 使用时加入到整瓶的一抗缓冲液中, 颠倒几次确保完全混匀。
- 4) **1,25D 生物素溶液**: 1,25D 生物素浓缩液以冻干品形式提供。使用时加入至整瓶的1, 25D生物素缓冲液中。盖紧瓶盖后室温下放置15-20分钟, 期间反复颠倒几次确保完全复溶。如果使用超过一次, 在复溶后的2小时内一定要冰冻保存(-20 $^{\circ}$ C) 。当再使用时须平衡至室温, 混匀后2小时内使用。
- 5) **洗液**: 将整瓶浓缩洗液加入至950 mL蒸馏水或去离子水中, 室温保存。
- 6) 其他所有试剂直接使用。
- 7) 所有试剂使用前应平衡至室温。
- 8) 试剂使用前须重复颠倒混匀。

3. 样本准备

- 1) 准备标记好的玻璃或塑料试管, 对应每个质控品和待测样本。脱酯的标准品不需要。
- 2) 在相应标记的试管中加入质控品或样本500 μ L。
- 3) 加入脱脂试剂**REAG | 1** 50 μ L至每个试管, 旋涡混合所有试管。
- 4) 2000 g 离心所有试管15 分钟。
注意: 当处理脱酯样本时, 请勿激起任何小颗粒, 如果出现悬浮或样本不清晰时, 应重新离心。

另一种样本准备

适用于样本量少于500 μ L的样本。

- 1) 准备标记好的锥形塑料管或微量离心管, 每个样本对应一个。
- 2) 加入样本(如250 μ L)至相应标记好的管。
- 3) 加入相当于样本量0.1 倍的脱脂试剂**REAG | 1** (如25 μ L)至每管中, 旋涡混合。
- 4) 2000 g 离心所有试管15 分钟, 或以10000 g离心10分钟 (微量离心机)。

4. 免疫提取步骤

- 1) 对免疫提取管**SORB**进行标记, 每个质控品和样本对应两个**SORB**。标准品不需免疫提取。注: 如**SORB**显示渗漏或装量不准确, 则切勿使用。
- 2) 旋涡混合器振荡免疫提取管, 并且允许固相粒子沉淀, 在泡沫架上竖立放置**SORB**3-5分钟。
- 3) 打开 **SORB** 的锥尖部, 加入脱酯样本或质控品各100 μ L至**SORB** (双孔测定), 再盖紧。
- 4) 放置**SORB**于泡沫架子上在室温下(18-25 $^{\circ}$ C)以每分钟5-20转的转速完全旋转90分钟。泡沫架可容易地夹到血液试管旋转器沟槽上。或者泡沫架插入适当的烧杯里放在一个瓶子滚筒上使之绕轴转动。

- 5) 将 **SORB** 直立在泡沫架上 3-5 分钟允许胶化体沉淀。轻拍移走黏附在拧盖上的任何胶化体。让胶化体沉淀1-2分钟。 拧松**SORB**锥尖部的盖子(不拧开), 将每个**SORB**放进塑料(或玻璃)管。离心机以低速(500-1000g) 分离样本大约1分钟。
- 6) 加入 去离子水**500 μL**至每个**SORB**, 小心地加入避免固相粒子溅出 **SORB**。离心机以低速(500-1000g) 分离大约1分钟洗涤胶化体。
- 7) 重复上述洗涤步骤二次。
- 8) 硼酸盐的玻璃管标记好, 将每个**SORB**转移到玻璃管。
- 9) 加入洗脱液**REAG I 2150 μL**至每个**SORB**。让洗脱液浸透固相粒子1到2 分钟。离心机以低速(500-1000 g)分离大约 1 分钟收集洗脱物。
- 10) 重复上面步骤二次。因此每个样本总收集洗脱液量为**450 μL**。
- 11) 丢弃**SORB**并且把管放在设定到**40°C**加热板或水浴箱中。在**氮气温和吹取下蒸发洗脱液20-30分钟, 确保管里没有剩余液体**。
- 12) 每管加入分析缓冲液 **BUF 100 μL**且旋涡混合器振荡溶解。
免疫提纯好的样本即可用于测定。

5. 检测操作程序

如试剂准备中描述, 检测前立即复溶标准品或解冻之前复溶的物质。使用前将所有试剂平衡至室温。检测前轻轻混匀所有试剂, 标记好硼酸盐的玻璃管, 每个标准品对应两个试管。

- 1) 加入每个标准品**CAL 100 μL**至相应标记好的试管。移液器直接对准试管底部。
- 2) 集合上面第 12 步的样本提取管。
- 3) 加入一抗溶液**Ab | SOLN 100 μL**至所有试管中。
- 4) 没有起泡沫的轻轻地旋涡震荡所有的管。**2-8°C**孵育过夜(16-20 小时)。
- 5) 第 4 步所得溶液各取**150 μL**加入到相应的抗体包被微孔中。留前两孔空置作空白。用封板膜封板后于**18-25°C**下置于振荡器上(500- 750rpm)振荡孵育90分钟。
- 6) 使用多道移液器加入**1,25D 生物素溶液 1,25D BIOTIN SOLN** 各**100 μL**至每孔(空白除外)。用封板膜密封后于**18-25°C**下置于振荡器上(500- 750rpm)振荡孵育60分钟。
- 7) 用洗液洗板三次:
 - a) 全自动洗板机: 设定洗板机每个孔至少**300 μL**的冲洗量, 注满和吸出三次循环。
 - b) 手工洗板: 迅速颠倒板架甩干孔内的液体, 加入洗液各**250 μL**至所有孔中, 倒出并重复二次。
 - c) 在进入下一个步骤前, 将微孔板反转并在吸水纸上轻拍以去除多余的洗液。
- 8) 使用多道移液器加入酶结合物**ENZYMCONJ** 各**200 μL**至每孔(空白除外), 用封板膜密封板孔后于**18-25°C**下孵育30分钟。
- 9) 重复步骤7。
- 10) 使用多道移液器加入底物**TMB**各**200 μL**至每孔(包括空白)。用封板膜密封板孔后于**18-25°C**孵育30分钟。
- 11) 注意: **TMB**底物易受污染。仅移取检测所需要的量, 丢弃没用完的**TMB**底物, 请勿再倒回瓶内。
- 12) 用多道移液器向每孔中各加终止液 **HCL 100 μL**。
- 13) 加入终止液30分钟内在酶标仪**450nm**波长(参考波长**650nm**)处读取吸光度。

【参考值(参考范围)】

下列参考范围采用 IDS 公司的 1,25 双羟维生素 D 检测试剂盒确定, 仅供参考。每个实验室应建立自己的参考范围。正常成人的 95%置信区间, 采集自美国 120 名明显健康成人, 根据 NCCLS 的 C28-A2 指引“如何确定临床实验室的参考区间”进行的非变量的方法计算。

正常成人 39-193 pmol/L (n=120)

肾病末期* <6-22 pmol/L (n=24)

*观察结果的范围

【检验结果的解释】

1. 结果计算

依下式计算每个标准品、质控品和未知样本的结合百分率(B/Bo%)

$$\text{结合百分率 (B/Bo\%)} = \frac{\bar{X} \text{ 平均吸光度} - \text{空白平均吸光度}}{\text{标准品0 平均吸光度} - \text{空白平均吸光度}} \times 100$$

绘制标准曲线：在半对数坐标纸上做出一条校准曲线（以 B/B0%为纵坐标，1,25-OH-VitD 浓度为横坐标）。每个待测样本都计算 B/B0%并且读数，在标准曲线上找对应的 1,25-OH-VitD 浓度值。

此外，还可采用自动化数据处理技术（如全自动数据处理程序），但是使用者应确定所选用的曲线是适当的并提供可接受的结果。推荐使用平滑的函数曲线或4PL曲线。

IDS 计算结果使用 MultiCalc (PerkinElmer) 数据分析软件 4PL 曲线测净吸光度对 VS 对数浓度。

本测定的报告范围为 6 – 500 pmol/L。任何低于最低标准品（6 pmol/L）的值是一个推断的值且可报告为 “<6 pmol/L”。

单位间的转化

$$X \text{ pmol/L} \times 0.42 = Y \text{ pg/mL}$$

$$Y \text{ pg/MI} \times 2.4 = X \text{ pmol/L}$$

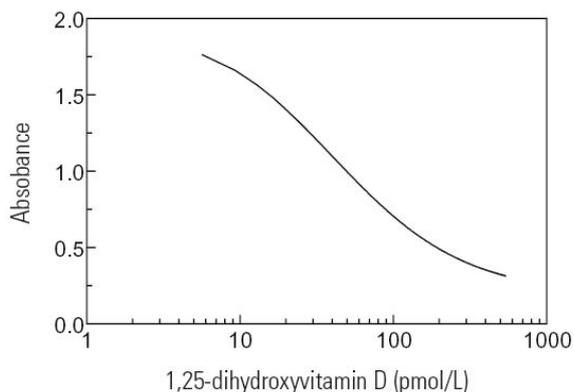
2. 样本分析数据

分析数据只作例证用且不可作为任何样本结果的计算。

孔号	记录数值	吸光度	平均值	B/B0 %	结果 nmol/L
A1A2	空白孔	-0.006 0.006	0.000		
B1B2	标准品0 0 pmol/L	1.956 1.992	1.974	100.0	
C1C2	标准品1 5.7pmol/L	1.746 1.776	1.761	89.2	
D1D2	校准2 13.4pmol/L	1.572 1.553	1.563	79.2	
E1E2	标准品3 34.0pmol/L	1.132 1.179	1.156	58.5	
F1F2	标准品4 112 pmol/L	0.682 0.686	0.684	34.7	
G1G2	标准品5 246 pmol/L	0.419 0.457	0.438	22.2	
H1H2	标准品6 544 pmol/L	0.315 0.304	0.310	15.7	
A3A4	样本 1	1.109 1.158	1.134	57.4	37.2
B3B4	样本 2	0.532 0.547	0.540	27.4	169

典型标准曲线

只作例证用。



【检验方法的局限性】

1. 分析可能低估正在接受维生素 D2 治疗中患者血循环中 1,25 双羟维生素 D 的数量。
2. 若样本的浓度可能超过最高标准品的浓度，使用前应对样本进行稀释。
3. 本分析特有的性能在儿科人群中还未能建立。

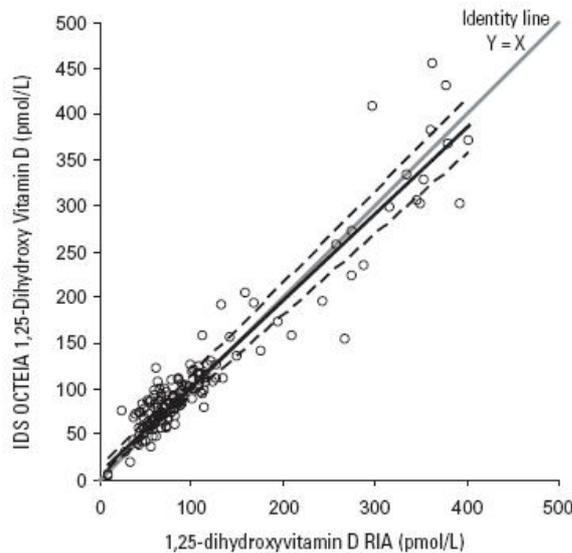
4. 诊断结果应结合患者的临床症状和其他的实验室的检查结果一起提供给临床医师进行解读。
5. 根据 NCCLS EP7-A “被认可的临床化学干扰测试指导方针”，对以下物质进行检测，发现下列物质在此浓度以下时对本试剂盒不会产生干扰：

血红蛋白水平低于 500 mg/dL
 胆红素水平低于 20 mg/dL
 脂类水平低于 2803 mg/dL
 尿素水平低于 500 mg/dL

【产品性能指标】

1. 精密度

IDS的1,25双羟维生素D检测试剂盒（酶联免疫法）与公认的放射免疫测定对比，定量测定1,25双羟基维生素D（根据NCCLS EP-9A2，“方法学对比和使用病人样本的偏差评估”）。152个样本选择较宽的1,25-双羟基维生素D水平[10 - 402 pmol/L]，采用每种方法进行测定。线性回归法用于对比数据分析：
 $IDS = 0.94(x) + 7.2$ (95% CI的斜率和截距分别为0.89—1.01, 2.1—12.7)；
 相关系数(r)=0.95



2. 灵敏度

灵敏度，定义为对标准品0进行20次重复测定的均值减去2个标准差，为6 pmol/L(2.5 pg/mL)。

3. 精密度

精密度的评估是根据NCCLS EP-5A2，“定量测定方法的精密度评估”进行。三个人血清质控品在超过49个操作日中进行测定，其中17个操作日内进行四次重复测定。这些检测由不同的操作人员采用不同的试剂批号来进行操作。

Control	n	mean (pmol/L)	Within-run		Within-device	
			SD	CV%	SD	CV%
1	28	19.0	2.0	10.7	3.8	19.7
2	28	53.2	5.6	10.5	9.1	17.1
3	28	152	14.1	9.3	26.7	17.6

4. 回收率

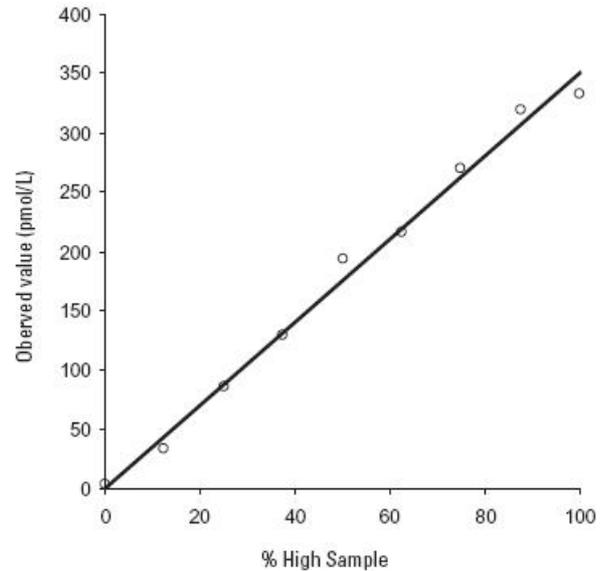
回收率是在提取和检测前在样本中加入1,25D₃后进行评估。

Sample Conc pmol/L	125D ₃ added pmol/L	Measured pmol/L	Recovery pmol/L	Recovery %
62.7	46.5	106.4	43.6	94%
62.7	93.0	140.7	78.0	84%
46.2	54.4	100.6	54.4	100%
46.2	108.8	161.3	115.1	106%
			Mean	96%

5. 线性

线性的评估是基于NCCLS EP-6A, “评估定量分析产品的线性: 一个统计学的方法” 上进行评估。样本 包含不同浓度的1,25双羟维生素D进行复孔测定。结果的平均值水平与已知的水平进行对比。样本在提取和检测前由高浓度的病人样本稀释和低浓度的样本稀释而成。报告的范围水平是<6-333 pmol/L。

Predicted Concentration pmol/L	Measured Concentration pmol/L	Variation	
		pmol/L	%
-0.1	2.5	2.6	-
43.8	32.7	-11.1	-25%
87.7	86.0	-1.7	-2%
132	129	-3.0	-2%
175	193	18.0	10%
219	215	-4.0	-2%
263	269	6.0	2%
307	319	12.0	4%
351	333	-18.0	-5%



6. 特异性

试剂盒的特异性分析是对以下分析物与标准品0结合50%时进行评估。

Analyte	Cross-reactivity
1,25-Dihydroxyvitamin D ₃	100 %
1,25-Dihydroxyvitamin D ₂	39 %
24,25-Dihydroxyvitamin D ₃	0.056 %
25-Hydroxyvitamin D ₃	0.009 %

【注意事项】

1. 本试剂盒仅供人或动物体外诊断使用, 不得内用, 必须严格按照说明书进行操作。由于不按说明书操作引起的损失和伤害(除了法令特别要求的), IDS 公司不承担任何由此引发的责任。
2. 本试剂盒包含人和/或动物来源的材料。盒中试剂应作为有潜在传染源来处理。储藏、操作和处理试剂应有适当的预防措施和良好的实验室操作。试剂的处理应当符合当地法令。
3. 人血清: 本产品所用到的质控品在制备过程中使用到的人源性材料经过 HIV I & II, HBV, HCV 检测(FDA 推荐)呈阴性。因为没有任何测试能完全保证传染源的不存在, 所有试剂应该按照生物安全 2 级水平处理;

4.叠氮化钠：标准品和质控品含有叠氮化钠 (NaN₃>0.1% (w/w)(<1%).

R22 吞咽时有害。

R52/53 对水生体有害，可导致水生环境长期的副作用。

S46 如不慎吞咽，应立即寻求专业医生建议并出示此容器或标志。

S36/37 穿戴合适的防护服和防护手套

S60 本材料及/或此容器应作为危险物进行处理。

试剂盒中的某些试剂以叠氮化钠作为防腐剂，可与铅、铜或黄铜反应形成高爆炸性的金属叠氮化合物，处理时应用大量的水进行冲洗，避免形成叠氮化合物。

5.洗脱试剂

洗脱试剂 REAG | 2 包含乙醇。

R11 高度易燃 (燃点13°C)。

S7 应保持紧闭容器。

S16 远离火源—不要吸烟。

6.0.5M 盐酸

终止液含有0.5M 盐酸。

R36/38 刺激眼睛和皮肤；

S26 如接触到眼睛，立即用大量水冲洗并寻求医生建议；

S36/37 穿戴合适的防护服和防护手套。

7.四甲基联苯胺

底物 TMB 含 3,3',5,5'-四甲基联苯胺。

R21/22 皮肤的接触或吞咽都有害。

S36/37 穿戴合适的防护服和防护手套

8.试剂效价可能降低的迹象

在任何一个试剂中有异常微粒子出现。

最高结合力下降。

高的非特异性结合出现。

正常姿态的曲线倾斜度变化。

【参考文献】

1. Iqbal, SJ, Vitamin D metabolism and the clinical aspects of measuring metabolites, Ann Clin Biochem, 1994, 31, 109 – 124.
2. Holis, BW, 1,25-Dihydroxyvitamin D₃ -26, 23-Lactone Interferes In Determination of 1,25-Dihydroxyvitamin D by RIA after Immunoextraction, Clin Chem, 1995, 41, 1313-1314.

【生产企业】

生产者名称：英国 IDS 公司 (Immunodiagnostic Systems Limited)

生产者/生产场所地址：10 Didcot Way, Boldon Business Park, Boldon, Tyne & Wear, NE35 9PD, UK

电话：+44 (0) 191 519 0660

传真：+44 (0) 191 519 0760

网址：www.idsltd.com

售后服务机构：北京荣志海达生物科技有限公司

地址：北京市海淀区永定路 88 号长银大厦 12 层 B12 室

电话：010-58895646

传真：010-58895611

电子邮箱：info@rz-biotech.com

网址：www.rz-biotech.com

【医疗器械注册证书编号】 国食药监械（进）字 2006 第 3401245 号

【产品标准编号】 YZB/IDS 004-2005

【说明书批准及修改日期】