



仅供科研使用，不得用于临床检验。

小鼠睾酮（T）定量检测试剂盒（ELISA）说明书

Cat No: QTJA20320

【产品名称】

通用名称小鼠睾酮（T）定量检测试剂盒（ELISA）

英文名称：Mouse Testosterone（T）ELISA KIT

【包装规格】

96T/48T

【预期用途】

仅供科研使用，定量检测血清、血浆、组织、细胞培养上清液中睾酮（T）的浓度。

【检验原理】

睾酮检测试剂盒（酶联免疫法）应用竞争法原理。在微孔板上包被（T）衍生物，在包被板微孔中加入校准品或待测样本、酶结合抗体。通过免疫反应，校准品（或样本）中的（T）和微孔上包被的（T）衍生物与酶标抗体竞争结合，形成抗原-酶标抗体复合物。洗涤后，加入底物溶液，经该复合物催化，产生显色反应。所产生的显色反应用吸光度（OD 值）来衡量，测定其吸光度（OD 值）。根据校准曲线即可算出样本中（T）的含量，吸光度（OD 值）随样本中（T）浓度的增加而降低。

【主要组成成分】

主要成分

组分	数量	主要成分
校准品	0.35ml/管*6 管	抗体配制的 6 个浓度标准品
包被微孔板	96T/48T	包被睾酮衍生物
酶结合物	6mL	HRP 标记的检测抗体
孵育液	6mL	含有解离剂成分
底物液 A	6mL	过氧化脲工作液
底物液B	6mL	TMB工作液
样本稀释液	6mL	--
20×浓缩洗涤液	30mL	含 0.15%Tween20 的 PBS
终止液	6mL	2mol/L 硫酸
说明书	1 份	--
自封袋	1 个	--
不干胶	2 片	--

校准品浓度依次为：24、12、6、3、1.5、0ng/mL

校准品已经通过测试，结果表明 HBs 抗原阴性，HIV1、HIV2 和 HCV 抗体阴性，由于不存在一种试验方法能够完全保证没有这些物质，本品必须按照具有潜在的感染性进行处理，处理过程应当遵循通用的安全措施。

需要但未提供的材料及耗材

- 1、酶标仪（450nm）
- 2、精密移液器及一次性吸头
- 3、蒸馏水
- 4、洗瓶或者自动洗板机
- 5、37℃水浴锅或恒温箱
- 6、500ml 量筒
- 7、无粉一次性乳胶手套

【储存条件及有效期】

- 1、2-8℃保存，切勿冷冻，有效期 6 个月。

2、开封使用后，包被微孔板放入带有干燥剂的自封袋中，密闭自封袋，并将全部试剂放回 2-8℃ 冰箱。

3、开封后，按照建议的条件保存，校准品、包被微孔板和 HRP 标记抗体，有效期为 14 天，其他成分在标签标明的有效期内是稳定的。

【适用仪器】

半自动的酶标仪，如 Thermo MK3，或者国产酶标仪。

【样本要求】

样本类型和采集

以下只是列出样品采集的一般指南。所有样本采集过程中，不得使用叠氮钠做为防腐剂。

1、细胞培养上清：4000rpm 条件下离心 20min，去除细胞颗粒和聚合物，上清液保存在-20℃ 以下，避免反复冻融。

2、血清：使用不含热原和内毒素的试管，操作过程中避免任何细胞刺激，4000rpm 条件下离心 20min，小心地分离出血清，保存在-20℃ 以下，避免反复冻融。

3、血浆：肝素，EDTA，或柠檬酸钠作为抗凝剂。在 4000rpm 条件下，离心 20 分钟取上清，血浆保存在-20℃ 以下，避免反复冻融。

4、组织：用预冷的 PBS (0.01 M, pH=7.4) 冲洗组织，去除残留血液，称重后将组织剪碎。将剪碎的组织与对应体积的 PBS (一般按 1: 9 的重量体积比，比如 1g 的组织样品对应 9 mL 的 PBS，具体体积可根据实验需要适当调整，并做好记录。推荐在 PBS 中加入蛋白酶抑制剂) 加入玻璃匀浆器中，在冰上充分研磨。为了进一步裂解组织细胞，可以对匀浆液进行超声破碎或反复冻融。最后将匀浆液 5000×g 离心 5-10 分钟，取上清检测。

样本保存和稳定性

样本在 2-8℃ 条件下，可以储存 72h，或者在-20℃ 储存 6 个月。样本收集后，不是一次检测完，请按一次用量分装冻存，避免反复冻融，使用时在室温下解冻，确保样品均匀充分解冻。

【检验方法】

操作程序

1. 将各种试剂移至室温平衡两小时，取浓缩洗涤液，根据当批检测数量，用蒸馏水 1: 20 稀释，混匀后备用。

2. 将预包被板从密封袋中取出，设一个空白对照孔，不加任何液体；每个校准品依次各设两孔，加入相应校准品 $50\ \mu\text{l}$ ；样本孔加入待测样本 $50\ \mu\text{l}$ ；然后每孔加入 $50\ \mu\text{l}$ 孵育液，轻轻震荡微孔板 10 分钟；
3. 每孔加入酶标抗体 $50\ \mu\text{l}$ （空白对照孔除外），充分混匀，贴上封板膜，置 37°C 温育 1 小时。
4. 手工洗板：弃去孔内液体，洗涤液注满各孔，静置 10 秒甩干，重复 3 次后拍干。洗板机洗板：选择洗涤 3 次程序洗板后拍干。
5. 每孔加显色剂 A 液 $50\ \mu\text{l}$ ，显色剂 B 液 $50\ \mu\text{l}$ ，振荡混匀后，置 37°C 避光显色 15 分钟，每孔加终止液 $50\ \mu\text{l}$ 。
6. 用酶标仪读数，单波长酶标仪需先用空白对照孔调零点，然后测定各孔吸光值。

【实验结果计算】

检测完成后，以标准品浓度做为纵坐标，对应的吸光度（OD 值）作为横坐标，利用计算机软件，采用四参数 Logistic 曲线拟合（4-p1），创建标准曲线方程，通过样本的吸光度（OD 值），利用方程计算样品的浓度值。

如果样品被稀释，通过上述方法测得的浓度值，要乘以稀释倍数，才是样品的最终浓度。

【产品性能指标】

1. 外观和物理检查：液体组分应澄清，无沉淀或絮状物；所有组分应无包装破损。各组分装量应符合要求。
2. 准确性：在样本中添加高、中、低三个浓度的孕酮制成样品，以试剂盒校准品进行分析测定，用四参数 Logistic 曲线拟合（4-p1），要求回收率在 80.0%~120.0%之间。
3. 线性：用四参数 Logistic 曲线拟合（4-p1），剂量-反应曲线相关系数（r）的绝对值应不低于 0.9900。
4. 精密度：批内精密度（CV%）应不高于 15.0%；批间精密度（CV%）应不高于 15.0%。
5. 最低检出限：试剂盒最低检出限应不大于 0.1ng/mL 。
6. 特异性：
与孕酮（P）、雌二醇（E2）没有显著交叉反应。
7. 稳定性

2°C – 8°C 保存，有效期 6 个月。

8、检测范围

1.5 ng/mL - 24 ng/mL

【注意事项】

生物安全

1、检测必须符合实验室管理规范的规定，严格防止交叉污染，所有样品、洗弃液和各种废弃物都应按照传染物进行处置。

2、试剂盒的液体组分中，含有 proclin-300 防腐剂，可能引起皮肤过敏反应，避免吸入烟雾与皮肤接触。

3、底物液对皮肤、眼睛和上呼吸道有刺激作用，避免吸入烟雾。戴上防护手套，实验完成后彻底洗手。

技术提示

1、混合蛋白溶液时，避免起泡。

2、加校准品与样本时，每个校准品浓度和样本都要更换移液枪头，公共组分应该悬臂加样，避免交叉污染。

3、合适的温育时间，和充分的洗涤步骤，是保证实验结果准确性的必要条件。

4、底物溶液为无色液体，保存过程中变为蓝色，代表底物溶液已经失效，不得使用。

5、终止液加样顺序与底物溶液加样顺序一致，加入终止液后，蓝色底物产物，会瞬间变为黄色。

6、实验中，用剩的板条，应立即放回自封袋中，密封（低温干燥）保存。

7、所有液体组分，使用前充分摇匀，严格按照说明书标明的时间、加样量及加样顺序进行温育操作。

废物处理

所有使用或未使用的试剂，所有污染性的一次性材料，应当遵循传染性或潜在传染性产品的处理程序，每个实验室都有责任根据其实验的类型和危险性级别，进行废物和污物的处理，同时要严格依照有关规定对待所有的废物和污物。