

# ELISA试剂盒使用说明书

## 睾酮 (Testosterone) ELISA Kit

本试剂盒用于定量检测哺乳动物血清、血浆及细胞上清液中的睾酮含量。使用前请仔细阅读说明书并检查试剂组分，如有任何疑问请与合肥兰杰柯科技有限公司联系，公司将为您提供强有力的技术支持。



全国统一热线：400-600-4213  
www.biosharp.cn

## 目录

一、产品简介	2
二、检测原理	2
三、试剂盒组分	3
四、储存条件	3
五、注意事项	3
六、实验过程需自备的仪器与材料	3
七、使用说明	4
7.1 样品处理及保存方法	4
7.2 试剂准备	4
7.3 操作步骤	4
7.4 操作要点提示	5
7.5 结果判断	5
八、常见问题分析及解决	7
九、实际加样情况表	8

# 睾酮 ( Testosterone ) ELISA KIT

货号	名称	规格
BQEN-574-96T	睾酮 (Testosterone) ELISA KIT	96T

## 一、产品简介

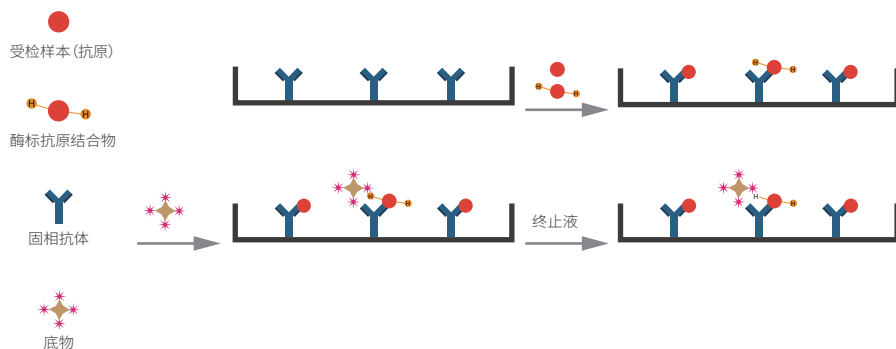
睾酮 (17 Hydroxy-4-Androstene-3-on)是C19类固醇激素,分子量288,是哺乳动物最重要的雄性激素之一。雄性体内的睾酮主要由睾丸合成;雌性由卵巢和肾皮质合成。在血浆中的睾酮由β球蛋白负责运输,称为性激素结合球蛋白(SHBG)。在循环系统中,有多达98%的睾酮以结合形式存在,游离睾酮在靶组织中,通过酶降解形成具有生理学活性的二氢睾酮。

睾酮与雄性第二性征的产生有关,测定其浓度对判断性腺发育不全很有意义。在雌性,睾酮水平增高多见于多毛症,在人类女性中,睾酮水平增高表现女性男性化,多囊卵巢,卵巢癌,肾上腺肿瘤和肾上腺增生。在人类男性中,睾酮水平增高与下丘脑垂体病变,睾丸肿瘤,先天性肾上腺增生和前列腺癌有关。

低睾酮水平可见于下列疾病:垂体功能减退、先天性睾丸发育不全、睾丸女性化、睾丸切除术、隐睾病、酶缺陷和一些自身免疫性疾病。

## 二、检测原理

本实验采用竞争法检测原理。用高特异性识别睾酮的抗体预包被酶标板,加入适度稀释的样本和HRP连接的睾酮结合物,样本中睾酮与睾酮结合物竞争性结合酶标板中包被的抗体,洗去游离成分;加入TMB底物,与抗体结合的睾酮结合物上带的HRP就会催化底物TMB反应,颜色显蓝色,中止后显黄色。如果样本中睾酮含量越多,则与包被的抗体结合的睾酮结合物则越少,颜色则越浅,即颜色与样本中的浓度成反比。



### 三、试剂盒组成

组分编号	组分	96t	储存条件
BQEN-574-1	<b>鞣酐HRP酶结合物</b>	<b>≥2支(冻干)</b>	<b>-20°C</b>
BQEN-574-2	样本稀释液	16mL	2-8°C
BQEN-574-3	鞣酐标准品	2支	2-8°C
BQEN-574-4	浓缩洗涤液 20×	30mL	2-8°C
BQEN-574-5	TMB底物	10mL	2-8°C
BQEN-574-6	终止液	5mL	2-8°C
BQEN-574-7	鞣酐抗体预包被板	12条	2-8°C
BQEN-574-8	封板胶纸	3张	2-8°C
	说明书	1份	

### 四、储存条件

产品收到后如果不立即使用,请根据提示将不同的组分放到对应的储存条件储存(冻干HRP酶结合物-20°C保存,其它组分2-8°C保存)。试剂盒有效期6个月,酶标板拆开后建议一个月内使用完毕。

### 五、注意事项

1. 未开封的试剂应保存在2-8°C。除辣根过氧化物酶标记鞣酐冻干粉-20°C保存。包装箔袋开封后,应立即封紧。开封后的包被微孔板储存在2-8°C下可以稳定6个星期。
2. 由于辣根过氧化物酶标记鞣酐是冻干粉,在制备后需要严格校准,所以瓶数应以实际收到的试剂盒为准。
3. 所有试剂和所需的微孔板条在使用前应平衡至室温。
4. 辣根过氧化物酶标记鞣酐冻干粉复溶加样后,为了确保其使用的准确性,如有剩余请丢弃避免再次使用。
5. TMB溶液请勿接触氧化剂和金属,避免失效。
6. 不同批号试剂不可混用。
7. 为避免交叉污染请使用一次性吸头。
8. 洗涤过程是至关重要的,洗涤不充分会使精确度下降并导致结果误差较大,请严格按照说明书的洗涤次数和浸泡时间进行洗涤(机器洗板按设定的程序洗板,人工洗板浸泡时间可适当延长)。
9. 在试验中标准品和样本检测时建议作双复孔或三复孔,加入试剂的顺序应一致,以保证所有反应孔孵育的时间一样。
10. 加样过程中避免气泡的产生。
11. 本产品仅限于专业人员的科学研究用,不得用于临床诊断或治疗,不得用于食品或药品,不得存放于普通住宅内。
12. 为了您的安全和健康,请穿实验服并戴一次性手套操作。

### 六、实验过程需自备的仪器与材料

1. 酶标仪(450nm)
2. 高精度可调移液器及吸头:0.5-10, 2-20, 20-200, 200-1000μL;一次检测样品较多时,最好用多通道移液器
3. 自动洗板机或洗瓶
4. 双蒸水或去离子水
5. 可控温水浴箱(37°C)。

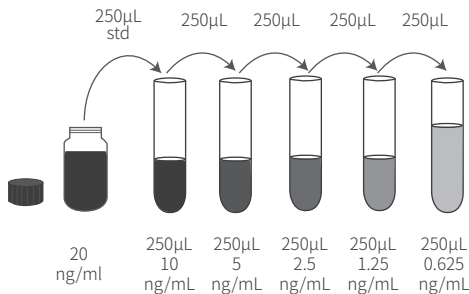
## 七、使用说明

### 7.1 样品处理及保存方法

- 1.血清:血清样本应是自然凝固后,取上清,样本收集时,请注意不同样本凝血时间尽可能保持一致。
- 2.血浆:血浆样本收集时,如果不能及时离心,需添加抗凝剂,建议尽量用EDTA抗凝剂。
- 3.细胞上清液:1000×g离心10min去除颗粒和聚合物。
- 4.保存:若样品不立即检测,请将其按一次用量分装,-20℃~-70℃保存,避免反复冻融。
- 5.避免使用明显溶血、黄疸、脂血样本,否则结果将不准确
- 6.如果样本中睾酮的含量高于20ng/mL,应将样本用试剂盒提供的零浓度样本稀释液稀释后再进行检测
- 7.稀释:可根据实际情况,将样本做适当倍数稀释(建议做预实验,以确定稀释倍数)。  
注:一些影响代谢的药物及含有5-羟色胺(血管收缩素)和其它生物胺相对含量较高的饮食也会影响检测的结果。

### 7.2 试剂准备

- 1.提前30min从冰箱中取出试剂盒,平衡至室温(25~28℃)。
- 2.洗涤缓冲液:将浓缩洗涤液用蒸馏水稀释成1×洗涤工作液(一份加19份水),稀释后的洗涤液在2-8℃下可以保存4个星期。未用完的放回4℃。
- 3.如有5×标准品稀释液,请按所需量用双蒸水或去离子水稀释(1份加4水)。
- 4.标准品:使用时直接取用睾酮标准品500μL(无需稀释),浓度为20ng/mL,作为最高浓度,用样本稀释液按倍比梯度稀释后依次加入检测孔中,0浓度标准品以样本稀释液直接加入,见下图(建议标准曲线使用以下浓度:20、10、5、2.5、1.25、0.625、0.3125、0 ng/mL)。稀释的标准品不得重复使用。



标准品稀释方法

### 7.3 操作步骤

- 1.按照上述准备工作配制好各种溶液。
- 2.根据待测样品数量和标准品的数量决定所需的板条数,并增加1孔作为空白对照孔,设置方法为该孔只加TMB显色液和终止液。
- 3.分别将样品和不同浓度标准品(25μL/孔)加入相应孔中,整个加样时间间隔时间不宜超过10分钟,否则可能会影响检测结果。
- 4.每支睾酮HRP酶结合物加入3mL的样品稀释液复溶10-15分钟达睾酮HRP酶结合物工作浓度。每孔加入75μL复溶后的工作浓度酶结合物,用封板胶纸封住反应孔,充分混合10秒钟。25-28℃避光孵育120分钟。酶结合物复溶后,不能保存,未用完的剩余部分建议丢弃。

5.洗板3次:(1)自动洗板机:要求注入的洗涤液为每孔300 $\mu$ L,注入与吸出间隔15-30秒。(2)手工洗板:甩尽孔内液体,每孔加洗涤液300 $\mu$ L,静置30秒后甩尽液体。最后一次洗板完成后将板倒扣在厚吸水纸上拍干。

注:请严格按照洗板次数洗板,洗涤操作的正确与否将影响整个实验分析的灵敏度和精密密度。

6.加入显色剂底物TMB 100 $\mu$ L/孔,避光,室温(25-28 $^{\circ}$ C)孵育20分钟。

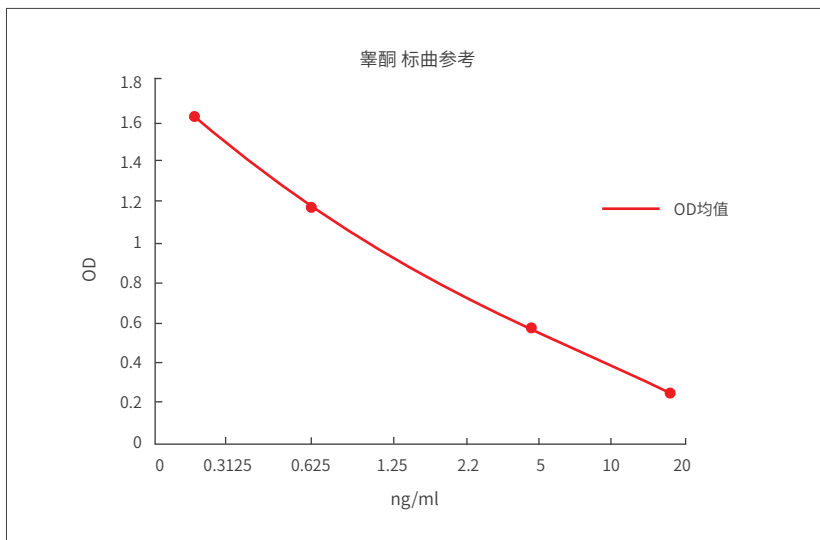
7.加入终止液50 $\mu$ L/孔,混匀后立即测量OD<sub>450</sub>值(参考波长600-650nm)。读取OD值最好在10分钟内完成。

## 7.4 操作要点提示

1. 配制各种试剂时要充分混匀,但要避免产生大量泡沫,以免加样时加入大量的气泡,产生加样误差。
2. 为避免交叉污染,在加入不同浓度的标准品、不同样品、不同试剂时谨记及时更换吸头。
3. 为了确保准确的结果,在每次孵育前均需使用新封板胶纸封住反应孔。
4. 显色剂在添加之前,应保持无色,请勿使用已变为蓝色的显色溶液。最佳显色时间对标准曲线很重要,肉眼可见前3-4孔有梯度蓝色,后3-4孔差别不明显,零孔无蓝色出现即可终止。
5. 每次检测均要做标准曲线,根据样品待测因子的含量,适当稀释或浓缩样本,最好做预实验。

## 7.5 结果判断

1. 每个标准品和标本的OD值应减去空白孔的OD值,如果做复孔,值在20%的差异范围内结果才有效,求其平均值。
2. 可根据使用习惯及实验室建立的模型,使用计算机软件计算相应的样本浓度。也可用EXCEL软件,标准曲线的将OD值放Y轴,浓度放X轴,拟合曲线,计算样本结果。
3. 若标本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算标本含量。
4. 参考数据:



注:本图仅供参考,应以同次试验标准品所绘标准曲线为准。

### 睾酮正常值范围

下表是睾酮正常范围的参考值:

	n	ng/mL
正常女性	33	0.1-1.2
正常男性	34	2.4-12

### 灵敏度

最低检测睾酮浓度为0.07ng/mL。最低检出量测定方法:20个零标准的平均OD值增加两个标准差,再计算相应的浓度。

### 特异性

本试剂盒对各种类似固醇类小分子化合物的交叉反应性见下表:

组分	交叉反应 (%)
睾酮	100
雄(甾)烯二酮	0.9
雄甾酮	0.9
5 $\alpha$ -二氢睾酮	<0.05
17 $\alpha$ -雌二醇	<0.05
雌激素酮	<0.05
雌激素三醇	<0.05
表睾(甾)酮	<0.05
17-OH孕酮	<0.05
氢化可的松	<0.005

回收率:在已知睾酮含量的正常人血清中加入一定浓度的睾酮。

样品	加入睾酮(ng/mL)	测量值(ng/mL)	回收率(%)
1	0	3	
	1	3.6	90
	2	4.9	98
	4	7.1	101
2	0	0.6	
	1	1.3	82
	2	2.1	81
	4	4.2	92
	8	8.0	93

## 八、常见问题分析及解决

问题	可能原因	解决办法	
无颜色	不同试剂盒或不同批号的试剂混合	重新检查试剂的标签, 确保所有组分都属于正使用的试剂盒中的。不能混用不同试剂盒或不同批号的试剂。	
	漏加酶	检查操作流程, 注意不要漏加	
	HRP酶污染了叠氮钠	使用新配制的试剂, 禁止叠氮钠	
	试剂配制/使用有误	重做试验, 严格按照说明书操作, 每次配制和使用前看清标签	
	超过有效期的产品可能会产生很弱的信号	检查产品有效期	
	缩短孵育时间能使实验信号变弱	检查孵育时间	
显色弱	使用了被污染的试剂	检查试剂是否被污染	
	仪器设定不正确, 滤光片不匹配	仪器是否设定正确, 滤光片的使用等	
	洗涤操作不规范	洗涤不充分, 使用手工洗板常出现	洗板不充分, 使用手工洗板常出现
		洗瓶洗涤, 每孔应完全充满洗涤缓冲液, 倾出时应迅速	洗瓶洗涤, 每孔应完全充满洗涤缓冲液, 倾出时应迅速
		若用洗板机, 应校准并设定足够充满每孔的体积量。板内侧不应接触设备	若用洗板机, 应校准并设定足够充满每孔的体积量。板内侧不应接触设备
检查每孔是否有残留的洗液或每孔加样量的体积是否准确		检查每孔是否有残留的洗液或每孔加样量的体积是否准确	
可在两次洗板之间加30秒的浸泡	可在两次洗板之间加30秒的浸泡		
高背景	实验中孵育温度和时间不适当	确定每一试验步骤的孵育温度和时间是否适当	
	酶加量过多	加酶前先看移液器调节量是否准确 检查稀释度, 若必要进行效价测定	
全部板子变成规则的蓝色	不充分的洗涤/洗涤步骤被遗漏使没结合的HRP仍有残留	最好使用洗板机充分洗涤 检查每孔是否有残留的洗液或加样量是否准确	
	太多的酶结合物	检查稀释度, 必要时进行效价测定	
	封板膜或试剂容器被重复使用, 导致HRP残留, 使TMB底物产生非特异蓝色	使用新封板膜, 每步使用不同的试剂容器	
高CV值花板	操作不慎或洗涤不充分	按说明书洗板、加样和显色, 洗板尤为重要	
	出现干板, 没有使用封板膜、封板膜重复使用	确定每两步骤间酶板应保持湿润 使用封板膜封口, 注意每步使用新鲜的封板膜	
	移液器不准确, 吸头重复使用	检查并校准移液器, 每次取样必须更换吸头	
	酶结合物不足	检查稀释度, 必要时进行效价测定	
标准曲线可得到, 但两点之间区别很差(低或平的曲线)	检测抗体不足	检查稀释度, 必要时进行效价测定	
	板子显色不足	延长底物孵育时间	
		使用推荐品牌的底物溶液	
标准曲线很好, 但没有任何期望的阳性信号	标本中无相应的待检测物质	使用内参对照	
	标本基质遮盖检测	重复实验, 重新考虑实验的相应参数 将标本至少做1:2相应的稀释, 或进行系列稀释	
标准曲线很好, 但标本的判读值很高	标本中含的待检物质水平超过实验范围	稀释标本	
边缘效应	工作环境温度不均衡	避免将板子在变化温度环境中孵育	
	实验过程中出现间断	整个实验应连续操作, 在实验开始前将所有的标准品和标本做适当的准备。	
	试剂没有按说明书平衡至室温	在所有试剂加入孔前, 确保它们已平衡至室温, 除非说明书中有另外的要求。	
	是否可更改试剂盒所提供的操作步骤?	一般厂商为确保最高的灵敏度, 对试剂盒都进行了优化, 为确保每一试剂盒实验的规范性应按说明书操作。	
漂移	是否可用不同批次试剂盒中的试剂?	不可以, 绝大多数试剂在每批试剂盒中是特异的, 若有问题可与厂家或代理商联系。	
	是否可增加或减少标本的体积?	商品化的试剂盒所需加入的标本体积是优化的, 应按说明书操作, 不建议更改所加标本体积。	
	是否可重新确定自己的标准曲线的点?	可以。说明书上有建议制备标准曲线时标准品的稀释度, 可改变稀释倍数和增加曲线的点, 但是必须在实验范围内, 高于试剂盒中最高标准品的点和低于灵敏度以下的点是无效的。	

实际加样情况表

1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12