



Human Testosterone ELISA Kit

目录号：ABC0032-48T

产品信息

产品名称	产品编号	规格
Human Testosterone ELISA Kit	ABC0032-48T	48T
	ABC0032-96T	96T

产品简介

睾酮（Testosterone）是一种类固醇激素。雄性睾酮主要由睾丸间质细胞分泌，雌性睾酮由卵巢肾上腺和外周脂肪细胞产生，在血液中睾酮可以与血清蛋白非特异性结合。睾酮具有维持雄性肌肉强度及质量，维持骨质密度及强度，提升机体体能等作用，并且睾酮还会影响血液生成，体内钙平衡，骨矿化作用，脂代谢，糖代谢和前列腺的增长。Human Testosterone ELISA Kit 通过竞争法酶联免疫吸附技术，体外定量检测人血清、血浆、细胞培养上清或其它相关液体中的睾酮，可同时检测天然的和合成的人睾酮。

储存与运输

冰袋运输；4℃保存，有效期 6 个月；开封后需在 4 周内用完。

需准备的材料设备

1. 能够检测 450 nm 吸光度的酶标仪，参考波长 630 nm（建议参考仪器使用说明提前预热）；
2. 单道或多道移液器及吸头，加样槽，离心管；
3. 蒸馏水或去离子水；
4. 干性滤纸或吸水纸；
5. 涡旋混匀仪，微孔板振荡器。

样本的采集与保存

1. **血清样本**：采集血样，静置 30 分钟，血液凝固。取液体部分进行离心分离，1000 g 离心 15 分钟，吸取上清即可检测，或者分装，分装上清置于-20℃以下保存，避免反复冻融。
2. **血浆**：用 EDTA、枸橼酸钠或肝素作为抗凝剂收集血浆样本，并将样本在采集后的 30 分钟内于 2-8℃1000 g 离心 15 分钟，吸取上清即可检测，或者分装，分装上清置于-20℃以下保存，避免反复冻融。



Human Testosterone ELISA Kit

目录号：ABC0032-48T

3. **细胞培养上清**：300 g 离心 10 分钟，吸取上清即可检测，或者分装，分装上清置于-20℃以下保存，避免反复冻融。

注意：

1. 样本如果浑浊，必须离心去除沉淀物，不适用严重溶血或高血脂的样本。
2. 以上样本均需密封保存，4℃保存不超过 1 周，-20℃保存不超过 1 个月，-80℃保存不超过 2 个月。
3. 冷冻样本使用前应缓慢平衡至室温。

试剂的配制

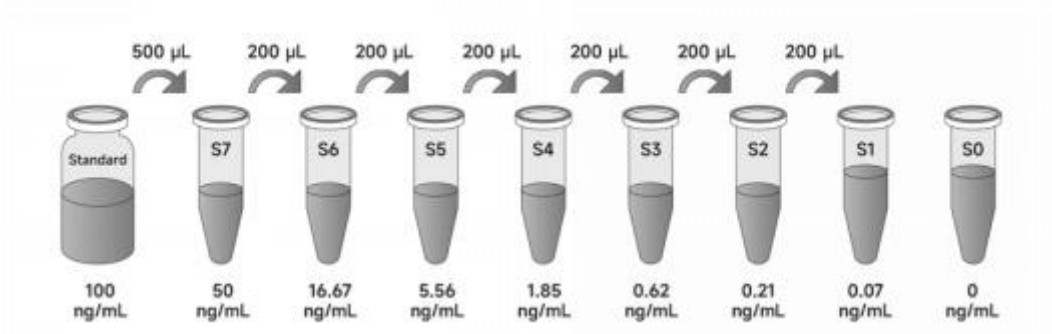
1. 提前 20 分钟将试剂盒及样本从冰箱中取出，平衡至室温。按实验需求取出本次实验所需板条和试剂，每次检测后剩余试剂请及时置于 4℃保存。
2. **1×洗液配制**：取 25×浓缩洗液 30 mL 至 1 L 的量筒，加蒸馏水或去离子水至 750 mL，轻轻混匀。转移至干净瓶内。
3. **标准品配制**：将稀释液 A 按照标签标注体积加入标准品中，轻柔涡旋振荡，确保充分混匀。重溶后的标准品浓度为 100 ng/mL，即为浓缩的人 Testosterone 标准品。重溶后静置 10 分钟，稀释前充分混匀。

a) 血清/血浆样本标准曲线制备：

充分混匀重溶后的标准品，取 500 μL 浓缩的人 Testosterone 标准品，加入 500 μL 稀释液 A，作为标准曲线的最高浓度 S7（50 ng/mL）。取 6 个 1.5 mL 离心管（S1-S6）依次排列，各加入 400 μL 稀释液 A。吸取 200 μL S7（50 ng/mL）标准品到第一个离心管 S6 中，轻轻吹打混匀。从 S6 中吸取 200 μL 到第二个离心管 S5 中，轻轻吹打混匀。以此类推进行标准品的 3 倍比稀释。S0 为稀释液 A。

b) 细胞培养上清样本标准曲线制备：

充分混匀重溶后的标准品，取 500 μL 浓缩的人 Testosterone 标准品，加入 500 μL 细胞培养基，作为标准曲线的最高浓度 S7（50 ng/mL）。取 6 个 1.5 mL 离心管（S1-S6）依次排列，各加入 400 μL 细胞培养基。吸取 200 μL S7（50 ng/mL）标准品到第一个离心管 S6 中，轻轻吹打混匀。从 S6 中吸取 200 μL 到第二个离心管 S5 中，轻轻吹打混匀。以此类推进行标准品的 3 倍比稀释。S0 为细胞培养基。



- 1×抗体配制: 抗体短暂离心, 用稀释液 A 按照 1:100 倍稀释至工作浓度。混匀制成 1×抗体工作液, 临用前配制。
- 1×酶标抗体配制: 酶标抗体短暂离心, 用稀释液 B 按照 1:100 倍稀释至工作浓度。混匀制成 1×酶标抗体工作液, 临用前配制。

注意:

1. 未开封的试剂盒: 未拆封的试剂盒可整盒保存于 4°C, 有效期 6 个月。
2. 已开封的试剂盒: 有效期 4 周, 冻干标准品溶解后不能再次使用, 剩余试剂及时放置 4°C 保存。此外, 请将未使用的板条用包含干燥剂的铝箔袋装好, 并拉紧密封铝箔袋, 置于 4°C 保存。

操作步骤

1. **加样:** 分别设标准孔、待测样本孔、空白孔。用稀释液 A 稀释标准品及样本, 设标准孔 7 孔 (S1-S7), 每孔依次加入 100 µL 不同浓度的标准品, 空白孔每孔加入 100 µL 稀释液 A, 余孔每孔加入待测样品 100 µL;

2. **加抗体:** 用稀释液 A 将抗体稀释至工作浓度, 每孔加抗体 50 µL。封板膜封板, 100-300 rpm 振荡 (保证每孔溶液不洒出且能充分混匀即可), 室温振荡孵育 1 小时;

注意: 1. 步骤 1 和 2 尽快完成, 前后间隔不超过 10min, 步骤顺序不能调换。

2. 请先查阅相关文献确定样本中待检测蛋白的大致浓度, 如果该浓度大于或者小于本试剂盒的最高或者最低标准品浓度, 请进行适当稀释或浓缩后再检测。

3. **洗板:** 自动洗板或手工洗板, 每孔洗涤液为 300 µL, 注入与吸出间隔 15-30 秒。洗板 5 次。最后一次洗板完成后将酶标板倒扣在吸水纸上适当用力拍干, 弃去孔内液体;

4. **加酶标抗体:** 用稀释液 B 将酶标抗体稀释至工作浓度, 每孔加酶标抗体工作液 (临用前配制) 100 µL, 更换新的封板膜封板, 100-300 rpm 振荡 (保证每孔溶液不洒出且能充分混匀即可), 室温振荡孵育 30 分钟;

5. **洗板:** 重复步骤 3;

6. **加显色液 TMB:** 每孔加 TMB 底物溶液 90 µL, 更换新的封板膜, 室温避光显色 (反应时间应控制在 10-30 分钟, 不要超过 30 分钟。当标准品的前 3-4 孔有明显的梯度蓝色, 后 3-4 孔梯度不明显时, 即可终止);



Human Testosterone ELISA Kit

目录号：ABC0032-48T

7. **加终止液：**每孔加终止溶液 50 μL ，终止反应，此时蓝色立转黄色。终止液的加入顺序应尽量与底物溶液的加入顺序相同。如出现颜色不均一情况，请轻轻晃动酶标板以使溶液混合均匀；
8. **读数：**在确保酶标板底部无水滴及孔内无气泡后，10 分钟内用检测波长 450 nm 读值。推荐用双波长即检测波长 450 nm、参考波长或校正波长 630 nm 同时读值，仅使用 450 nm 读值会降低准确度。

注意事项

1. 试剂盒按说明书保存，使用前室温平衡 20-30 分钟。
2. 标准品为冻干粉，所需加入的稀释液体积及稀释倍数，请严格按照试剂盒说明书进行操作。为保证标准品的精确性，标准品配制使用后，如果有剩余请勿再次使用。
3. 25 \times 洗液在低温下可能有结晶，如果发现结晶，请 37 $^{\circ}\text{C}$ 温育使结晶完全溶解后再配制成工作液。
4. TMB 对人体有刺激性，操作时请注意适当防护，避免试剂直接接触皮肤和眼睛。如不慎接触，请立即用大量清水清洗。
5. 试剂盒中的终止液为酸性溶液，操作时请注意适当防护，避免试剂直接接触皮肤和眼睛。如不慎接触，请立即用大量清水清洗。
6. 如果发现显色液 TMB 出现混浊或颜色变成蓝色，请立即停止使用。
7. 不宜混用不同批号的试剂盒组份，每批次试剂盒均经过独立测试，不能混用。
8. 本试剂盒的操作在室温进行，要求严格控制室温在 25-28 $^{\circ}\text{C}$ 。温度低于 25 $^{\circ}\text{C}$ 会导致最终检测到的吸光度显著下降。
9. 检测标准品和样品时建议设置重复孔，以确保检测结果的可信度。
10. 在试剂盒的贮存或孵育过程中请避免强光照射。
11. 加样过程中需避免气泡的产生。
12. 在操作试剂盒或处理样本时请穿实验服，佩戴乳胶或一次性手套。
13. 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。
14. 为了避免微生物的污染及试剂与样本间的交叉污染，加样时请注意每个样品或标准品必须更换枪头。
15. 洗涤过程中反应孔中残留的洗涤液应在滤纸上充分拍干，滤纸上看不到水印。勿将滤纸直接放入反应孔中吸水。

结果分析

1. 结果计算

为了获得更准确的实验结果，建议标准品及样本进行复孔检测。计算标准品和样本的平均 OD 值，然后减去空白孔的 OD 值。

以标准品浓度为横坐标，OD 值为纵坐标，用计算机软件进行回归拟合生成标准曲线，相关系数 R 值越接近 1，拟合效果越好。回归分析确定最佳拟合曲线。



Human Testosterone ELISA Kit

目录号：ABC0032-48T

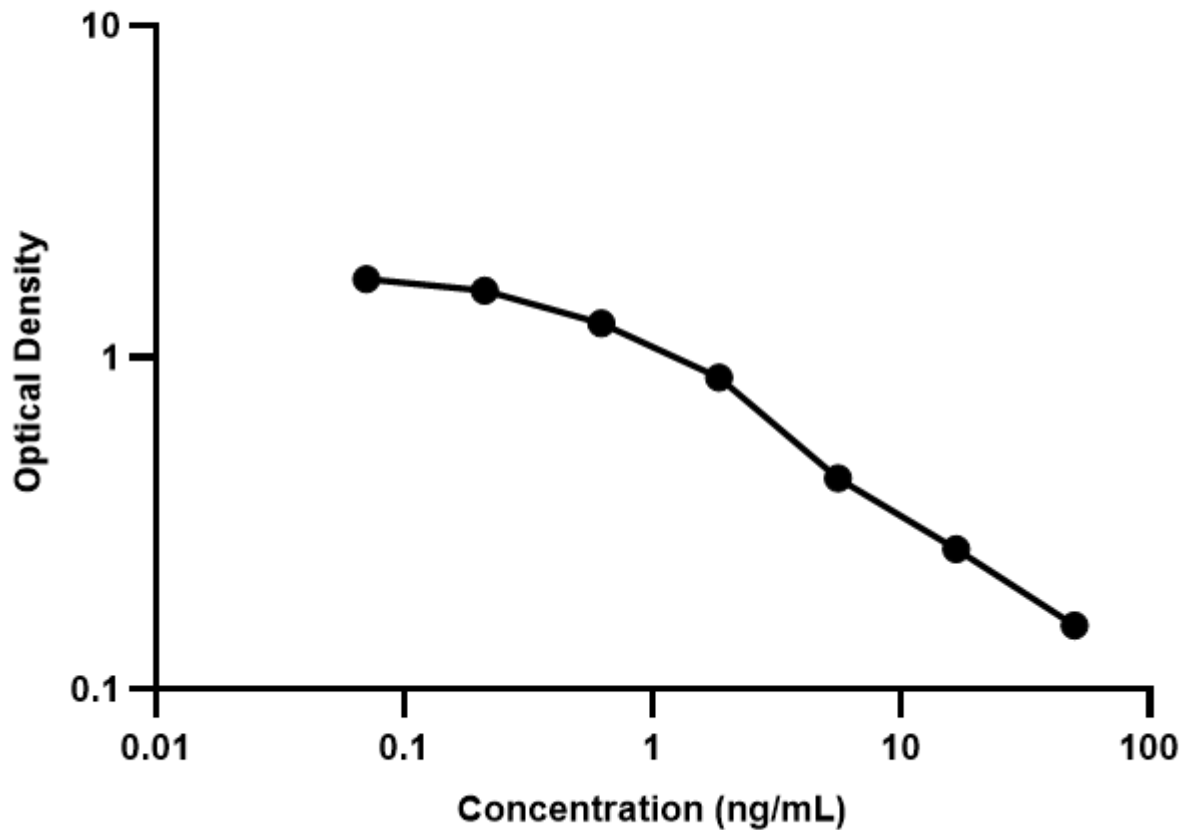
代入样本检测 OD 值，计算出样本浓度，若样本进行了稀释，应乘以稀释倍数，即为样本的实际浓度。通过对浓度值和 OD 值取对数拟合，可以对标准曲线进行线性化。此过程可能可以得到更多样本的浓度，但数据的准确度会降低。

2. 典型数据

每次检测每块酶标板都必须设立单独的标准曲线。由于实验操作条件的不同（如操作者、洗板条件和温度条件等），每次实验标准曲线的 OD 值会有所差异。说明书提供的标准曲线仅供参考。

ng/mL	OD		Average
50	0.159	0.152	0.156
16.67	0.270	0.260	0.265
5.56	0.434	0.429	0.432
1.85	0.868	0.870	0.869
0.62	1.262	1.273	1.268
0.21	1.581	1.595	1.588
0.07	1.733	1.702	1.718
0	1.883	1.816	1.850

Human Testosterone Standard Curve



检测步骤概要

1. 实验前按说明书准备标准品、试剂及样本；
2. 先加样（标准品或样本）100 μ L/孔，再加入抗体工作液 50 μ L/孔，连续加样，10 分钟内完成。混匀后室温振荡 1 小时；
3. 洗涤 5 次后拍干，加酶标抗体工作液 100 μ L/孔，室温振荡 30 分钟；
4. 洗涤 5 次后拍干，加 TMB 底物 90 μ L/孔，室温避光孵育 10—30 分钟；
5. 加终止液 50 μ L/孔；
6. 10 分钟内于 450 nm 波长处检测 OD 值，参考波长 630 nm。