

## Testosterone ELISA Kit

产品编号	产品名称	包装
PT872	Testosterone ELISA Kit	96次

### 产品简介:

- 碧云天的睾酮 ELISA Kit (Testosterone Enzyme-Linked ImmunoSorbent Assay Kit), 即睾酮酶联免疫吸附检测试剂盒, 是一种用于特异性地高灵敏地定量检测所有哺乳动物血清、血浆或细胞培养上清液中的睾酮的ELISA试剂盒。
- 本产品检测灵敏度高, 特异性强, 重复性好。多次重复检测结果表明, 最小检出量为0.07ng/ml, 与雄烯二酮和雄甾酮具有0.9%的交叉反应性, 与5- $\alpha$ -二氢睾酮、17- $\alpha$ -雌二醇和雌激素酮等其他类似固醇类小分子交叉反应性均小于0.05%, 与氢化可的松交叉反应性小于0.005%。
- 睾酮(Testosterone), 又称睾丸素、睾丸酮、睾甾酮等, 是一种类固醇雄激素, 主要由睾丸间质细胞产生, 其代谢产物有两种, 分别是二氢睾酮(Dihydrotestosterone, DHT)和雌二醇(Estradiol)。睾酮主要参与精子形成以及第一、第二性征的发育和维持, 除此之外, 睾酮同样参与免疫抑制、骨密度调节、血管舒张、突触可塑性以及前列腺癌和糖尿病等生理病理过程。和其它类固醇类激素相同, 睾酮的产生也受到垂体激素的调控。当受到促性腺激素释放激素(Gonadotropin Releasing Hormone, GnRH)的刺激后, 垂体前叶首先分泌黄体生成素(Luteinizing Hormone, LH), LH作用于睾丸间质细胞膜受体, 经由cAMP依赖胆固醇合成途径诱导睾酮合成。促卵泡激素(Follicle Stimulating Hormone, FSH)通过作用于精原细胞能够间接影响睾丸间质细胞的功能和类固醇生成。睾酮和GnRH之间存在着负反馈调节现象。成年男性每天大约产生5mg的睾酮, 大多数睾酮都与性激素结合球蛋白或白蛋白结合, 游离的睾酮和白蛋白结合睾酮都具有一定的生物活性。
- 游离睾酮能够穿过细胞膜, 与胞质内的雄激素受体(Androgen Receptor, AR)作用, 形成的复合物能够进入细胞核影响DNA转录。AR的活化还能激活蛋白激酶, 引起细胞Ca<sup>2+</sup>内流。在5- $\alpha$ 还原酶作用下, 睾酮会变成二氢睾酮, 与睾酮相比, 二氢睾酮与AR的亲合力更高。在芳香化酶的作用下, 睾酮还能转变为雌二醇, 与相应的雌激素受体结合, 作用于特定组织。
- 本试剂盒采用竞争法ELISA (Competitive ELISA)检测样品中睾酮的浓度, 其原理见图1。高特异性识别睾酮的抗体已预包被于酶标板上, 同时加入样品和辣根过氧化物酶标记睾酮, 样品中的睾酮与辣根过氧化物酶标记睾酮竞争性结合酶标板中包被的抗体, 随后洗去游离的睾酮与游离的辣根过氧化物酶标记睾酮。最后加入显色剂TMB溶液, 固相捕获的辣根过氧化物酶就会催化无色的TMB氧化成蓝色物质, 在加入终止液后呈黄色。如果样本中睾酮含量越多, 则与抗体结合的辣根过氧化物酶标记睾酮就越少, 颜色越浅, 即颜色与样品中的浓度成反比。通过酶标仪检测450nm处的吸光度值就能实现定量检测。睾酮浓度与A450值呈反比, 通过绘制标准曲线, 对照样品吸光度值, 即可计算出样品中睾酮浓度。

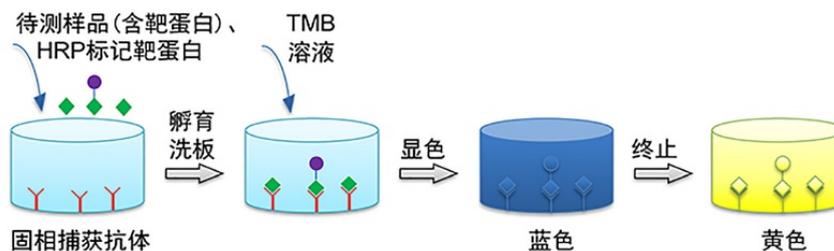


图1. 竞争法ELISA原理图。

- 一个包装的本试剂盒, 包括标准品检测, 可以进行96次检测。

### 包装清单:

产品编号	产品名称	包装
PT872-1	Testosterone抗体预包被板	8孔×12条
PT872-2	Testosterone标准品	2瓶
PT872-3	样品稀释液	16ml
PT872-4	辣根过氧化物酶标记Testosterone	2-4瓶
PT872-5	洗涤液(20X)	30ml
PT872-6	TMB溶液	10ml
PT872-7	终止液	5ml
PT872-8	封板膜(透明)	2张

PT872-9	封板膜(白色)	2张
—	说明书	1份

### 保存条件：

辣根过氧化物酶标记Testosterone 4°C保存，1-2周内有效，-20°C保存6个月内有效；试剂盒其它组分4°C保存6个月内有效。除辣根过氧化物酶标记Testosterone外，试剂盒其它组分严禁冻存。

### 注意事项：

- 由于辣根过氧化物酶标记睾酮一般是冻干粉，在制备后需要严格校准，所以具体瓶数请以实际收到的试剂盒为准。
- 洗涤液(20X)在低温下可能有结晶，如果发现结晶，请室温水浴加热使结晶完全溶解后再配制工作液。
- 为保证标准品的精确性，辣根过氧化物酶标记睾酮配制使用后，如果有剩余请勿再次使用。
- TMB溶液请勿接触氧化剂和金属，否则容易失效。
- 加样时，请注意每个样品或标准品必须更换枪头，一方面避免交叉污染，另一方面也避免吸取体积的误差。
- 由于本试剂盒均经过独立测试，所以请勿混用不同货号 and 不同批次的试剂盒组分，即使是同种试剂盒不同批次的试剂盒组分也不能混用。多个试剂盒同时检测时，请独立使用各个试剂盒中的试剂，请勿使用不同试剂盒中相同名称的组分。
- 充分混匀对保证反应结果的精确性很重要，在加液后请轻轻晃动整个96孔板，以保证混匀。
- 本试剂盒很多操作在室温进行，要求严格控制室温在25-28°C。温度低于25°C会导致最终检测到的吸光度显著下降。
- 洗涤过程非常重要，洗涤不充分会使精确度下降并导致结果误差较大。
- 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。
- 加样过程中须避免气泡的产生。
- 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。
- 为了您的安全和健康，请穿实验服并戴一次性手套操作。

### 使用说明：

#### 1. 样品准备

- a. 样品的准备请按下列流程进行操作：
    - (a) 细胞上清样品离心取上清即可(如100-500g，5分钟)。
    - (b) 对于血清样品，将全血在室温下放置30分钟至2小时，不要剧烈摇晃以免溶血，待全血自然凝固并析出血清后，4°C约1000-2000g离心10分钟，取黄色上清即得血清，注意不要吸取白色或淡黄色沉淀。制备好的血清需置于冰上待用。
    - (c) 对于血浆样品，采集的全血建议使用EDTA进行抗凝处理，混匀后置冰上，4°C约1000-2000g离心10分钟，取黄色或淡黄色上清即得血浆，注意不要吸取白色沉淀。制备好的血浆需置于冰上待用。
    - (d) 若待测样品不能及时检测，样品制备后请分装，冻存于-20°C或-80°C，并注意避免反复冻融。
  - b. 血清样品不应添加任何防腐剂或抗凝剂。
  - c. 样品应清澈透明，检测前样品中如有悬浮物应通过离心去除。
  - d. 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会影响检测结果。
  - e. 请勿使用溶血、黄疸、高血脂或污染的样品检测，否则结果将不准确。
- 注：血清或血浆样品需要用样品稀释液适当稀释后再检测。

#### 2. 检测前准备工作

- a. 试剂盒从冰箱中取出后应置室温(25-28°C)平衡20分钟；每次检测后剩余试剂请及时置于4°C保存。
- b. 配制适当量的洗涤液：将洗涤液(20X)用双蒸水或去离子水稀释至1X，例如10ml洗涤液(20X)加190ml水混匀后即为1X的洗涤液。
- c. 取5个洁净的1.5毫升离心管，每管预先加入250μl的样品稀释液，并参考图2进行标准品的倍比稀释，最终得到20、10、5、2.5、1.25、0.625、0.3125ng/ml共六个标准品浓度，最后将稀释好的标准品依次加入预包被板孔中，样本稀释液直接加入作为0ng/ml，共八个标准品浓度。

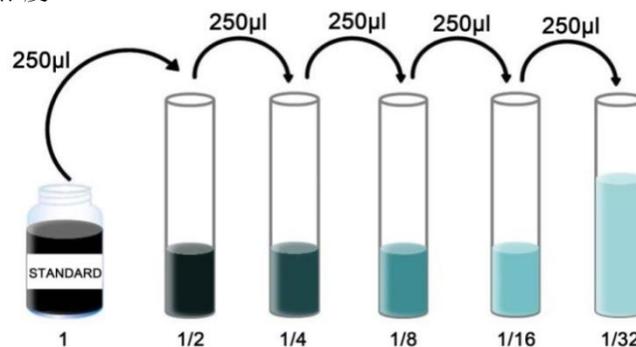


图2. 标准品倍比稀释示意图。按标准品(STANDARD)标签上标注体积加入标准品稀释液溶解并混匀后的浓度为标准品的起始浓度。其它的倍比稀释后的浓度依次为起始浓度的1/2、1/4、1/8、1/16和1/32。

- d. 配制辣根过氧化物酶标记睾酮溶液：按照标签标注体积，取样品稀释液至1瓶辣根过氧化物酶标记睾酮中，置于25-28°C复溶10-15分钟。所需体积为“75 $\mu$ l $\times$ (标准品孔数+样品孔数)”。如果1瓶辣根过氧化物酶标记睾酮配制后的体积不足所需体积，请使用更多瓶数的辣根过氧化物酶标记睾酮，并在合并混匀后使用。

### 3. 洗涤方法

自动洗板机或手工洗板：每孔洗涤液为300 $\mu$ l，注入与吸出间隔15-30秒。洗板5次。最后一次洗板完成后将板倒扣在厚吸水纸上适当用力拍干。

### 4. 实验过程需自备的材料和仪器

- 不同规格的移液枪及相应的吸头
- 酶标仪
- 自动洗板机(如果没有也可以手工洗板)
- 去离子水或双蒸水

### 5. 操作步骤

- 计算并确定一次实验所需的预包被板条数，取出所需板条放置在96孔框架内，暂时用不到板条请放回铝箔袋密封，保存于4°C。
- 每次实验都需加入标准品并绘制出标准曲线，同时建议设置本底校正孔，即空白孔，设置方法为该孔只加TMB溶液和终止液。
- 分别将样品或不同浓度标准品按照25 $\mu$ l/孔加入相应孔中，样品稀释液作为0浓度标准品加入，随后再按照75 $\mu$ l/孔加入配制好的辣根过氧化物酶标记睾酮，充分混合10秒钟，用封板膜(白色)封住反应孔，室温避光孵育120分钟。如果样品中睾酮含量超出检测范围，应将样品用零浓度样品稀释液稀释后再进行测定。请注意记录好样品的稀释倍数。  
注意：请先查阅相关文献确定样品中待检测睾酮的大致浓度，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，请适当稀释或浓缩后再进行检测。
- 洗板3次，且最后一次置于厚吸水纸上拍干。
- 加入显色剂TMB溶液100 $\mu$ l/孔，用封板膜(白色)封住反应孔，室温避光孵育15-20分钟。室温偏低时需要适当延长孵育时间，此时可以孵育至标准品出现非常显著的颜色变化，若样本浓度足够高也会出现显著的颜色变化。
- 加入终止液50 $\mu$ l/孔，混匀后立即测量A450值。

### 6. 结果分析

- 复孔的值通常在20%的差异范围内结果才有效，复孔平均值可作为测量值。
- 每个标准品或样品的吸光度值应减去本底校正孔的吸光度值(如果没有做校正孔，则不需要减去)。
- 绘制标准曲线。以标准品浓度为横坐标，以A450值或结合率(每个标准品对应的OD值除以零浓度对应的OD值)为纵坐标，以平滑线连接各标准品的坐标点。通过样品的吸光度值和标准曲线计算出样品的相应浓度。

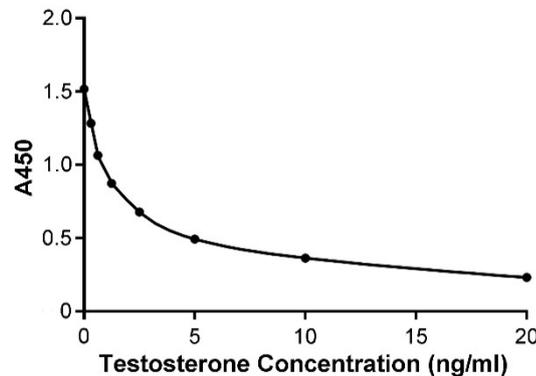


图3. Testosterone ELISA Kit的标准曲线。实测数据会因实验条件、检测仪器等的不同而存在差异，图中数据仅供参考。

- 若样品OD值高于标准曲线上限，应适当稀释后重新测定，计算浓度时需注意乘以样品的稀释倍数。

### 相关产品：

产品编号	产品名称	包装
PE223	Estradiol ELISA Kit	96次
PP773	Progesterone ELISA Kit	96次
PT872	Testosterone ELISA Kit	96次