

小鼠双氢睾酮(DHT) ELISA

定量检测试剂盒说明书

- 货号： BNEK-M-631110
- 检测范围： 0.05-36 μ g/mL
- 规格： 96T/48T
- 保存温度： 2-8 $^{\circ}$ C
- 种属： 小鼠
- 有效期： 6个月

产品仅供教研使用，用于定量检测细胞培养上清、血清、血浆中小鼠DHT。

使用本产品之前，必须完整阅读本说明书。仅供科研使用，不能于临床诊断或治疗。

简介

双氢睾酮（DHT，5 α -双氢睾酮，5 α -DHT，雄甾醇酮或斯坦诺酮）是一种内源性雄性类固醇和荷尔蒙。DHT 由睾酮在 5 α -还原酶的作用下转化而来，5 α -还原酶主要在身体的外周组织中形成，在某些组织，包括前列腺、精囊、附睾、皮肤、毛囊、肝脏和大脑中，催化从睾酮形成 DHT。DHT 与受体蛋白质在细胞内结合成的复合体进入附属腺的细胞核中，促进新的蛋白质合成，显示出比睾酮稍强的雄性激素作用。

检测原理

本试剂盒采用间接竞争 ELISA 方法，在酶标板微孔条上预包被偶联抗原，样本中 DHT 和微孔条上预包被的偶联抗原竞争 DHT 抗体，加入酶标二抗后，形成包被抗原-抗体-酶标二抗复合物。随后结合的酶催化 TMB 底物显色，样本吸光值与其含有的 DHT 成负相关。通过标准曲线可准确定量样品中 DHT 的含量。通过标准曲线计算所得值乘以样品处理的稀释倍数即为实际样品中 DHT 的含量。

检测实验的局限性

本试剂盒仅供科研使用，不能用于临床诊断或治疗。

试剂盒的使用期限不得超过试剂盒标签上的有效期。不要将试剂与其他批次或来源的试剂混合使用或替换使用。

如果样品产生的值高于最高标准，则用测定稀释剂进一步稀释样品，并重复测定。稀释剂、实验员、移液技术、洗涤技术、培养时间或温度以及试剂盒使用年限的任何变化都可能导致结果变化。

样本采集、处理和存储的变化可能会导致样本值的差异。

本试剂盒实验设计消除了不同生物样品中可能潜在的干扰因素的影响，但并不能涵盖所有潜在影响因素。不能排除存在其他干扰的可能性。

操作要点及注意事项

混合蛋白质溶液时，应始终避免起泡。为了避免交叉污染，在添加每个标准品、样品和试剂时应更换移液器枪头。此外，每种试剂应单独使用容器。

确保试剂不间断地添加到板孔中。为了确保准确的结果，在孵育步骤中需要粘合好封板膜。

当使用自动洗板机时，在加入洗涤缓冲液后加入30秒的浸泡期，或者在洗涤步骤之间将板旋转180度，可以提高测定精度。

显色剂应保持无色，直到添加到板中。确保显色剂不受光线照射。显色剂应从无色变为蓝色。

应按照与显色剂相同的顺序将终止液添加到板中。加入终止液后，孔中形成的颜色将从蓝色变为黄色。绿色的孔表示终止液未与基质溶液充分混合。

此试剂盒提供的终止液为稀硫酸溶液，具有一定腐蚀性，应谨慎操作。

该试剂盒中的某些成分含有防腐剂，可能会引起皮肤过敏反应，应佩戴口罩避免吸入薄雾。

显色剂B可能会引起皮肤、眼睛和呼吸道刺激，应佩戴口罩避免吸入薄雾。

佩戴防护手套、防护服、眼睛和面部防护用品。处理后彻底洗手。

试剂盒组成及储存条件

名称	规格（48T）	规格（96T）	备注
预包被酶标板	8×6 条	8×12 条	2-8℃
标准品	1 支×100μL	1 支×200μL	2-8℃
100×一抗试剂	1 支×50μL	1 支×100μL	2-8℃
100×酶标二抗	1 支×50μL	1 支×100μL	2-8℃

20×浓缩稀释液	1 支×15mL	1 支×25mL	2-8℃
显色液 A	1 支×3mL	1 支×6mL	2-8℃
显色液 B	1 支×3mL	11 支×6mL	2-8℃
终止液	1 支×3mL	支×6mL	2-8℃
20×浓缩洗涤液	1 支×15mL	1 支×25mL	2-8℃
封板胶纸	2 张	2 张	无
产品说明书	1 份	1 份	请仔细阅读

需要的其他材料

- 酶标仪，包含450nm测定波长，同时包含600-680nm校正波长更佳；
- 移液器及枪头；
- 蒸馏水或去离子水
- 100-1000 mL刻度量筒。
- 洗瓶、排枪或自动微孔板清洗机。
- 水平轨道微孔板振荡器，能够保持500±50 rpm的速度。
- 用于稀释标准品和样品的试管。

样品处理及要求

下面列出的样品收集和储存条件旨在作为一般性指导。样品稳定性尚未评估。

细胞培养上清液：在1000×g下离心15分钟去除颗粒，立即进行测定或等分装样品，并将样品储存在≤-20℃的温度下。避免重复冻融循环。（由于基质效应，细胞培养上清

液样品建议预实验以确定稀释倍数)

血清: 使用血清分离管, 使样品在室温下凝结30分钟, 然后在1000×g下离心15分钟。立即取出血清并进行测定或等分装样品, 将样品储存在 $\leq -20^{\circ}\text{C}$ 的温度下。避免重复冻融循环。(由于基质效应, 血清样品建议2倍稀释。例如: 50 μL 样品+50 μL 的1×稀释液)

血浆: 使用EDTA或肝素作为抗凝剂收集血浆。收集后30分钟内, 以1000×g离心15分钟。立即测定或等分装样品, 并将样品储存在 $\leq -20^{\circ}\text{C}$ 的温度下。避免重复冻融循环。(由于基质效应, 血浆样品建议2倍稀释。例如: 50 μL 样品+50 μL 的1×稀释液)

注: 柠檬酸盐抗凝剂血浆未经验证可用于本试验, 使用时应自行验证可行性。溶血的样品不适合用于该测定。

组织匀浆: 用预冷的PBS(0.01M, pH=7.4)冲洗组织, 去除残留血液(匀浆中裂解的红细胞会影响检测结果), 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9mL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, 于冰上充分研磨或匀浆机研磨。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。最后将匀浆液于5000×g离心5-10分钟, 取上清检测。

细胞裂解液: 贴壁细胞用预冷PBS轻轻清洗, 然后用胰蛋白酶消化, 1000×g离心5分钟后收集细胞; 悬浮细胞可直接离心收集。收集的细胞用预冷PBS清洗3次, 每 1×10^6 个细胞中加入150-200 μL 的PBS重悬(推荐在PBS中加入蛋白酶抑制剂; 若含量很低可适当减少PBS体积)并通过反复冻融或超声使细胞破碎。将提取液于2-8 $^{\circ}\text{C}$, 1500×g离心10分钟, 取上清检测。

其它样本类型: 1000×g离心20分钟, 取上清即可检测。

样品外观: 样品应清澈透明, 悬浮物应离心去除。

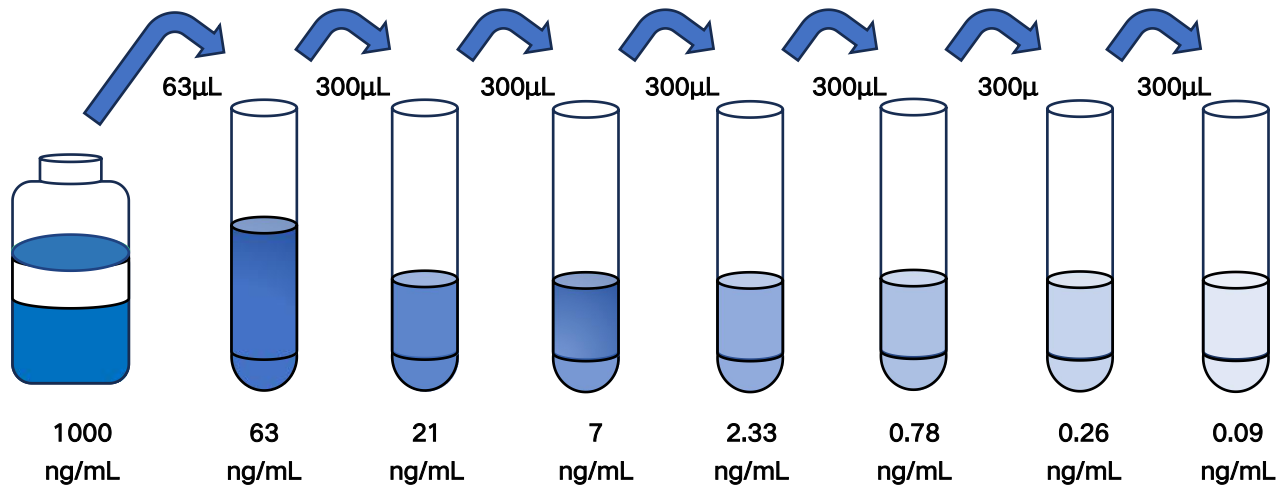
样品保存: 样品收集后若在 1 周内进行检测的可保存于4 $^{\circ}\text{C}$, 若不能及时检测, 请按一次使用量分装, 冻存于-20 $^{\circ}\text{C}$ (1个月内检测), 或-80 $^{\circ}\text{C}$ (6个月内检测), 避免反复冻融, 标本溶血会影响最后检测结果, 因此溶血标本不宜进行此项检测。

试剂准备工作

使用前将所有试剂置于室温平衡30分钟左右。

洗涤液/稀释液配置：如果洗涤液/稀释液（20×）有晶体析出，需在37℃下加热至晶体全部溶解。用蒸馏水1:20稀释（例如：1mL 浓缩洗涤液加入19mL的蒸馏水）

标准品配置：试剂盒中取出标准品，准备7个试管，先将1000ng/ml标准品（200μL）按需吸取一定量用1×稀释液稀释至63ng/mL（例：63μL的标准品母液+937μL的1×稀释液，制备得到1000μL的63 ng/mL浓度标准品），随后在6个试管中分别加入600μL的1×稀释液，在这6个单独的试管中将63ng/mL标准品依次3倍倍比稀释至6个梯度，共配制7个浓度的标准品，依次为：63ng/mL、21ng/mL、7ng/mL、2.33ng/mL、0.78ng/mL、0.26ng/mL、0.09ng/mL，从最高浓度标准品溶液中吸取300μL标准品到下一个试管中，轻轻吹打混匀，以此类推进行标准品的倍比稀释（如图所示），1×稀释液用作零浓度标准品(0ng/mL)。



一抗工作液配置: 使用前10分钟, 用1×稀释液将100×一抗工作液稀释成1×一抗工作液, 根据所需用量配置。

酶标二抗工作液配置: 使用前10分钟, 用1×稀释液将100×酶标二抗稀释成1×酶标抗体工作液, 根据所需用量配置。

备注: 如待测样本中DHT浓度高于标准品最高值, 请根据实际情况选择适当的稀释倍数。

实验步骤

所有标准品、样品建议复孔检测

1. 酶标板准备: 确定试验所需要的孔数, 取下未使用的酶标条放回装有干燥剂的铝箔袋。
2. 样本孵育: 每孔分别加入 50μL 不同浓度的标准品/预处理过的待测样品, 同时加入一抗试剂 50μL/孔 (加一抗试剂时请使用多道移液器), 盖上封板膜在 37℃下孵育 30 分钟。孵育结束后, 每孔加入 300μL 1×洗涤缓冲液, 轻轻晃动 30 秒, 甩干并在纸上拍干, 以这种方式清洗 3 次。
3. 二抗孵育: 每孔加入 100μL 酶标二抗工作液, 轻轻混匀, 盖上封板膜在 37℃下避光孵育 30 分钟。孵育结束后, 重复步骤 1 中的清洗方式清洗 4 次。

4. 底物显色：每孔首先加入 50 μ L 显色液 A，随后加入 50 μ L 显色液 B，轻轻混匀，盖上封板胶纸，37 $^{\circ}$ C 避光反应 15 分钟。
5. 终止反应：待显色反应结束后，每孔加入 50 μ L 终止液，轻轻混匀，5 分钟内用预热完成的酶标仪在 450nm 处测吸光值。

结果的计算

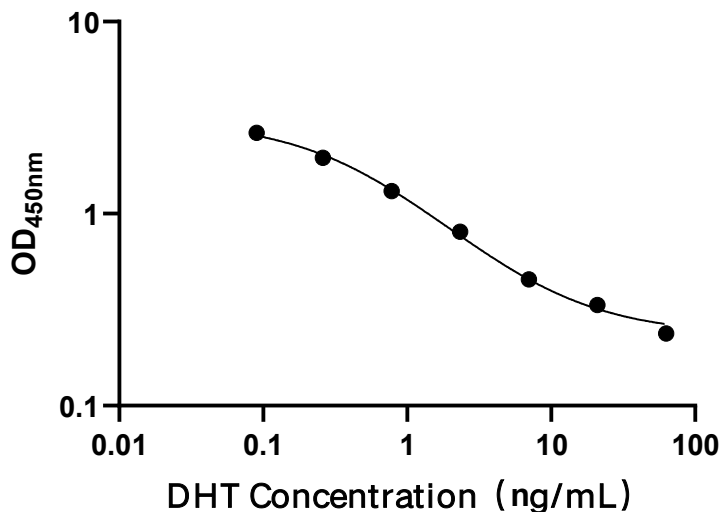
以样本浓度的对数为横坐标，OD 值的对数为纵坐标，绘出四参数逻辑函数的标准曲线。或者使用能够生成四参数逻辑（4-P）曲线拟合的计算软件来创建标准曲线。

若样品 OD 值高于标准曲线上限，应适当稀释后重测并在计算样本浓度时乘以相应的稀释倍数

示例数据

以下数据和曲线仅供参考，实验者需根据自己的实验数据建立标准曲线。

标准品浓度 (ng/mL)	63	21	7	2.33	0.78	0.26	0.09	0
OD 值	0.238	0.334	0.455	0.805	1.313	1.954	2.635	2.944



本图所示标准曲线仅供示例，结果计算应以同次试验标准品所绘标准曲线为准计算样本

结果。

精密度

批内精密度：三组已知的高、中、低浓度样品，进行二十次在同一个板块内精度评估。

批内变异系数 CV%小于 10%。

批间精密度：三组已知的高、中、低浓度样品，进行二十次在不同板块内精度评估。

批间变异系数 CV%小于 15%。

回收率

样本回收率：80%-120%。

灵敏度

经样本测试，本试剂盒的检测灵敏度为0.09ng/mL。

线性关系

校准品剂量反应曲线相关系数 r 值，大于等于 0.998。

特异性

小鼠双氢睾酮：100%。

参考文献

ELISA Plate Template											
	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11 12
A											
B											
C											
D											
E											
F											
G											
H											

生产企业: 重庆博纳创源生物科技有限公司

技术支持: 13251494839

技术邮箱: support_bionow@163.com