

仅供科研使用，不得用于临床诊断

## 小鼠雄烯二酮（ASD）定量检测试剂盒（ELISA）

定量检测血清、血浆、细胞培养上清液、组织中小鼠雄烯二酮（ASD）的含量。

使用试剂盒前，必须仔细阅读本说明书。

---

## 实验原理

采用酶联免疫竞争法检测血清中雄烯二酮含量。首先用羊抗兔包被微孔板，制成固相二抗，然后加入待测血清、辣根过氧化物酶标记雄烯二酮以及抗雄烯二酮抗体，使之形成包被二抗-抗雄烯二酮抗体-雄烯二酮（HRP）复合物，标记雄烯二酮的结合量与血清中的雄烯二酮量成反比。经显色后在酶标仪测定吸光值（OD值），通过计算机或作图拟合浓度—吸光度曲线，反算出待测血清中雄烯二酮含量。

## 试剂盒限制性

- 1、仅供科研使用，不得用于临床诊断。
- 2、在试剂盒标示的有效期内使用，过期产品不得使用。
- 3、跟其他厂家的试剂盒或者组分不能混用。
- 4、样品需要稀释的话可以用 PBS（PH7.4）稀释。
- 5、如果样本值高于最高标准品浓度值，请将样本适当稀释后，再重新测定。
- 6、待测样本中可能存在的异嗜抗体会干扰检测结果，检测前，请排出该因素。
- 7、通过其他方法得到的检测结果，与本试剂盒测定结果不具有直接的可比性。

## 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、使用自动洗板机时，加入一个 30 秒浸泡的步骤，可以提高检测精度。
- 5、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。
- 6、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。
- 7、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。
- 8、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。

## 试剂盒组分与保存

未开封的试剂盒保存在 2-8 度，不得使用过期试剂盒。

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	预包被固相抗体
HRP 标记抗原	6mL	HRP 标记的检测抗原
底物液 A	6mL	过氧化脲工作液
底物液 B	6mL	TMB 工作液
抗体	6mL	抗雄烯二酮抗体
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：12、3、0.96、0.24、0.06、0nmol/L

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。

## 其他用品

- 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

## 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。

仅供科研使用，不得用于临床诊断。

- 
- 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。
  - 4、戴上防护手套，实验完成后彻底洗手。

## 样品的采集和储存

### 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，EDASDA，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，每孔加入相应校准品 50 μl；其余每个检测孔直接加待测血清 50 μl。

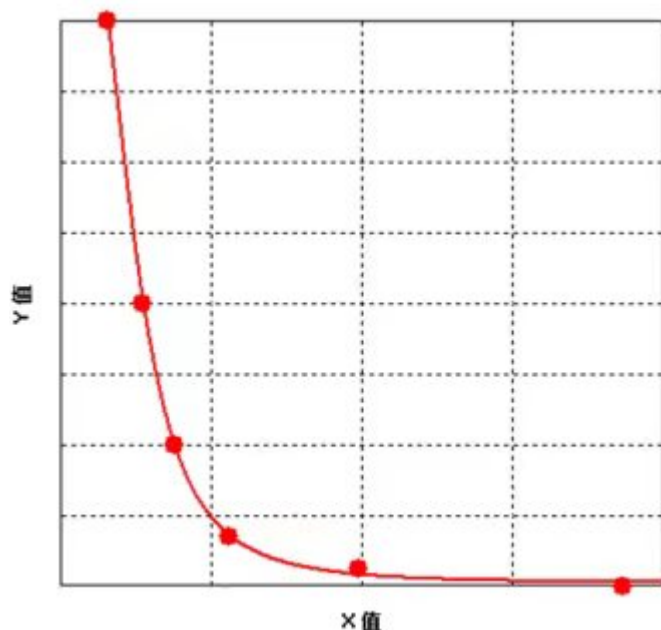
3. 每孔加入酶标抗原  $50\ \mu\text{l}$  (空白对照孔除外), 再按同样的顺序每孔加入抗体  $50\ \mu\text{l}$ , 充分混匀, 贴上封板膜, 置  $37^\circ\text{C}$  温育 1 小时。
4. 手工洗板: 弃去孔内液体, 洗涤液注满各孔, 静置 10 秒甩干, 重复 3 次后拍干。洗板机洗板: 选择洗涤 3 次程序洗板后拍干。
5. 每孔加显色剂 A 液  $50\ \mu\text{l}$ , 显色剂 B 液  $50\ \mu\text{l}$ , 振荡混匀后, 置  $37^\circ\text{C}$  避光显色 15 分钟, 每孔加终止液  $50\ \mu\text{l}$ 。

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。

### 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-pl), 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。



(示意图, 仅供参考)

### 试剂盒性能指标

#### 1、物理性能

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。各组分装量不少于组分表中要求。

#### 2、剂量反应曲线线性

仅供科研使用, 不得用于临床诊断。

---

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。

### 3、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 15%。

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%。

### 4、灵敏度

最低检出限：试剂盒最低检出限应不大于 0.1nmol/L。

### 5、回收率

三组已知的高、中、低浓度样品，进行五次在同一个板块内回收率评估，回收率在 85%-115% 之间。

### 6、稳定性

2℃-8℃ 保存，有效期 6 个月。

### 7、检测范围

0.06-12nmol/L