

孕酮 ELISA 试剂盒

产品编号: SEKSM-0002

该试剂盒用于检测血清、血浆及细胞上清等样本中孕酮的浓度

仅供研究，不用于临床诊断

订购热线: 400-968-6088 * 技术支持邮箱: service@solarbio.com

公司官网: www.solarbio.com

目 录

背景介绍	1
检测原理	1
注意事项	2
技术要点	3
试剂盒组成及储存	4
自备实验器材（不提供，可代购）	4
试剂准备	6
检测步骤	7
操作流程图	8
结果计算	9
典型数据	9
常见问题及解决方法	12
相关产品	13
发表优秀文献	13

背景介绍

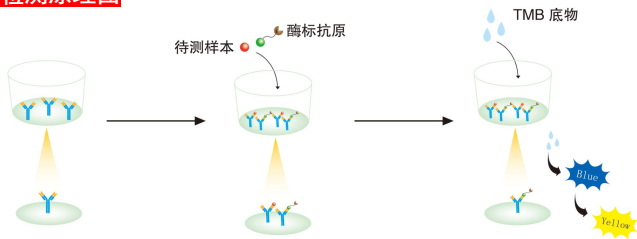
孕酮又称黄体酮，是一种由体内的胆固醇转化合成的 C21 类固醇，由卵巢、胎盘和肾上腺分泌，在充足雌激素存在时，孕酮能使子宫内膜由增殖期改变为分泌期，为孕卵着床提供有利条件。孕酮产生途径，先由胆固醇可转化为孕烯醇酮，再通过脱氢酶和异构酶的综合作用，转化为孕酮。体内孕酮的绝大部分可在肝脏内被代谢为孕二醇，与葡萄糖苷酸而结合形成复合物，然后通过肾脏排出。

研究表明孕酮有多种靶器官，并有不同的效应。生殖器官是孕酮的主要靶器官。在人类男性中，孕酮乃是产生皮质类固醇和雄激素的必需中间物。对人类女性而言，孕酮在月经周期的卵泡期间，保持相对的恒定，排卵后，其浓度迅速上升，并可在 4—6 天内一直保持这种上升状态，此后于月经开始前 24 h 降低至初始水平。在女性的妊娠期，胎盘的持续产生孕酮使得血清中的浓度达到 10~20 倍黄体期的孕酮的水平。

检测原理

Solarbio (Solarbio®) ELISA 试剂盒采用基于竞争法的酶联免疫吸附检测技术。将高特异性识别孕酮的抗体包被于酶标板上；实验时，分别加入梯度稀释的标准品和预稀释的样本，然后加入 HRP 标记的孕酮，样品中的孕酮与标准品中的孕酮竞争酶标板上固定的包被抗体；洗板后加入显色剂底物 TMB，若反应孔中样本存在不同浓度的孕酮，则 HRP 会使无色 TMB 变成不同深浅（负相关）的蓝色物质，加入终止液后反应孔会变成黄色；最后，在 $\lambda_{\max}=450\text{ nm}$ ($\text{OD}=450\text{ nm}$) 处测定反应孔样品吸光度 (OD)，孕酮浓度与 OD450 值之间呈反比，通过绘制标准曲线计算出样品中孕酮的浓度。

检测原理图



注意事项

1. 试剂盒中的终止液为酸性溶液，操作人员在使用时请戴上手套并注意防护；在操作过程中也要避免所有试剂接触皮肤和眼睛，如果不慎接触，请用大量清水清洗；检测血液样本及其它体液样本时，请按国家生物实验室安全防护有关管理规定执行。
2. 试剂盒未使用时应保存在 2~8℃ 冰箱在有效期内使用。
3. 试剂盒使用前请在室温恢复 30 min，且充分混匀试剂盒里的各种成份及制备的样品。
4. 试剂盒不能一次使用完，请在恢复室温后，将需要用的酶标板条拆下，将剩余的用封板膜贴好后放回密封袋中封好。
5. 在试验中标准品和样本建议做复孔检测，且加入试剂的顺序应保持一致。为保证结果准确，每次检测均需做标准曲线。
6. 为避免交叉污染，请在试验中使用一次性 EP 管，枪头，封板膜（※）及洁净塑料容器。
7. 各试剂在使用前请摇匀，混合时避免出现气泡。

8. 请不要使用其他批号或其他来源试剂盒内含的试剂代替本试剂盒中的试剂。

技术要点

1. 当重溶或者混匀标准品时，应轻柔混匀，始终避免气泡产生。
2. 充分混匀对反应结果尤为重要，最好使用微量混匀器（使用低频率进行混匀）。
3. 在应用自动洗板机时，加入洗液之后，设置 10~30 s 的浸泡程序，或者在不同的洗涤步骤将微孔板掉转 180 度，这样可以提高洗板的效果。
4. 为保证结果的精确性，孵育时用封板膜封好酶标板条。
5. 显色底物在添加之前应是无色的，保持显色底物始终处于避光状态。
6. 终止液的添加顺序应与显色底物的添加顺序相同。
7. 添加终止液之后，底物的颜色应由蓝色转变为黄色。如果底物呈现绿色，说明终止液与显色底物没有充分混匀。
8. 要求样本进行预实验检测，根据实验设计进行适当的样本稀释，以确保样品值在试剂盒标曲范围内。
9. 在任何情况下，避免接触微孔板的内表面和外表面。

试剂盒组成及储存

试剂盒组成	规格 (96T)	规格 (48T)	保存条件
抗体预包被酶标板	8*12	8*6	2~8℃
标准品	2 支	1 支	2~8℃
SR1 标准品/样本稀释液	16 mL/瓶	8 mL/瓶	2~8℃
冻干孕酮 HRP 酶结合物 (0.5 mL 复溶)	2 瓶	1 瓶	2~8℃
浓缩洗涤液 (20×)	30 mL/瓶	15 mL/瓶	2~8℃
显色底物 (避光)	10 mL/瓶	5 mL/瓶	2~8℃
终止液	5 mL/瓶	2.5 mL/瓶	2~8℃
封板胶纸	4 张	2 张	
说明书	1 份	1 份	

※注意：试剂盒应在有效期内使用，请不要使用过期的试剂
所有试剂瓶盖须旋紧以防止蒸发和微生物污染。

自备实验器材 (不提供, 可代购)

1. 酶标仪 (主波长 450 nm, 参考波长 630 nm)
2. 高精度移液器及一次性吸头: 0.5~10, 2~20, 20~200, 200~1000 μ L
3. 洗板机或洗瓶
4. 双蒸水或去离子水
5. EP 管, 量筒, 吸水纸
6. 37℃孵育箱

样本收集

血清样本：

室温血液自然凝固 30 min 后，在 4℃条件下 1000×g 离心 15 min，然后将上清等量分装于小 EP 管并于 -20℃以下保存（24 h 内检测可放入 2~8℃储存），保存过程中如有沉淀，请再次离心，避免反复冻融。

血浆样本：

将全血收集到含抗凝剂的管中，根据标本的实际要求选择 EDTA，柠檬酸钠或肝素作为抗凝剂，混合 20 min，在 4℃条件下 1000×g 离心 15 min，然后将上清等量分装于小 EP 管并于 -20℃以下保存（24 h 内检测可放入 2~8℃储存），避免反复冻融。

细胞培养上清：

将细胞培养基移至无菌离心管，在 4℃条件下 1000 ×g 离心 10 min，然后将上清等量分装于小 EP 管并于 -20℃以下保存（24 h 内检测可放入 2~8℃储存），避免反复冻融。

组织匀浆：

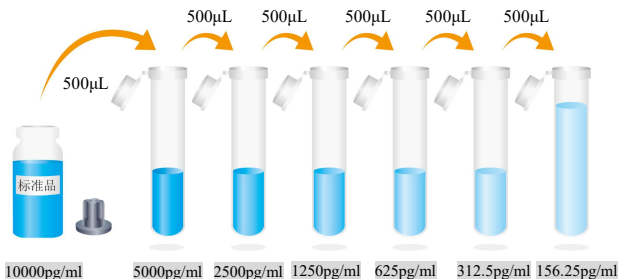
用预冷的 PBS（0.01M，pH=7.4）冲洗组织，去除残留血液，称重后将组织剪碎。将剪碎的组织与对应体积的 PBS（一般按 1:9 的重量体积比，比如 1 g 的组织样品对应 9 mL 的 PBS，具体体积可根据实验需要适当调整，并做好记录。推荐在 PBS 中加入蛋白酶抑制剂）加入玻璃匀浆器中，在冰上充分研磨。为了进一步裂解组织细胞，可以对匀浆液进行反复冻融或超声破碎。最后将匀浆液于 2~8℃，5000×g 离心 5~10 min，取上清检测。

※特别注意：

1. 本试剂盒可能适用于其他生物样本，必须进行实验验证。
2. 检测前，样本中可见的沉淀必须去除。
3. 血清、血浆样本避免使用溶血、高血脂样本，以免影响检测结果。
4. 如果样本中的靶标物检测浓度高于标准品的最高值，请将样品做适当倍数稀释后检测，正式实验前必须做预实验以确定稀释倍数。

试剂准备

- 试剂回温：**在实验前 30 min 将试剂盒、待测样本放置于室温下，浓缩洗涤液如出现结晶，请放入 37°C 温浴直到结晶全部溶解。
- 配制洗涤液：**预先计算好稀释后的洗涤液使用体积，然后用双蒸水或去离子水将 20× 浓缩洗涤液稀释成 1× 应用液，未用完的浓缩洗涤液放入 4°C 冰箱保存。
- 标准品梯度稀释：**标准品原液浓度为 10000 pg/mL，每支 1 mL，稀释前充分混匀，按照以下浓度进行 2 倍稀释：10000、5000、2500、1250、625、312.5、156.25 pg/mL 进行稀释。10000 pg/mL 为标准曲线最高点浓度，**SR1 标准品/样本稀释液**作为标准曲线的 0 孔（0 pg/mL）。标准品稀释方法具体如下图。



4. 洗涤方法：

- **自动洗板：**甩尽酶标板孔中液体，在厚迭吸水纸上拍干，注入洗涤液为 300 μL/孔，注入与吸出间隔为 30 s，按检测步骤中的洗板次数，重复此洗板步骤。
- **手工洗板：**甩尽酶标板孔中液体，在厚迭吸水纸上拍干，用洗瓶加入洗涤液 300 μL/孔，静置 30 s 后甩净酶标板孔中液体，在厚迭的吸水纸上拍干，按检测步骤中的洗板次数，重复此洗板步骤。

检测步骤

检测之前请将所有的试剂、样本平衡至室温。

1. 准备好所有需要的试剂。
2. 分别设定标准孔、0 孔和样本孔，计算好当次试验所需要的板条数量，将不需要的板条拆卸下来，用新的封板膜重新封好，放回装有干燥剂的铝箔袋。
3. 加样：加标准品/样本 90 μL 到对应的微孔中；加样过程在 10 min 内完成。
4. 加酶结合物：提前用样本稀释液每瓶加 0.5 mL 复溶 15~20 min，每孔加入 10 μL 酶结合物，充分混合 10 s。

特别注意：酶结合物复溶后，不能保存，未用完的剩余部分建议丢弃！！

5. 孵育：用盖板膜盖板后室温（ $25\pm 2^{\circ}\text{C}$ ）静置避光反应 120 min。
6. 洗板：小心揭开盖板膜，将孔内液体甩干，用洗涤工作液 300 μL /孔，充分洗涤 3 次，每次间隔 30 s，最后一次用吸水纸拍干。

提示：为获得理想的实验结果，必须彻底移除残留液体。洗板完成之后，请立即进行下步操作，不要让微孔板干燥。

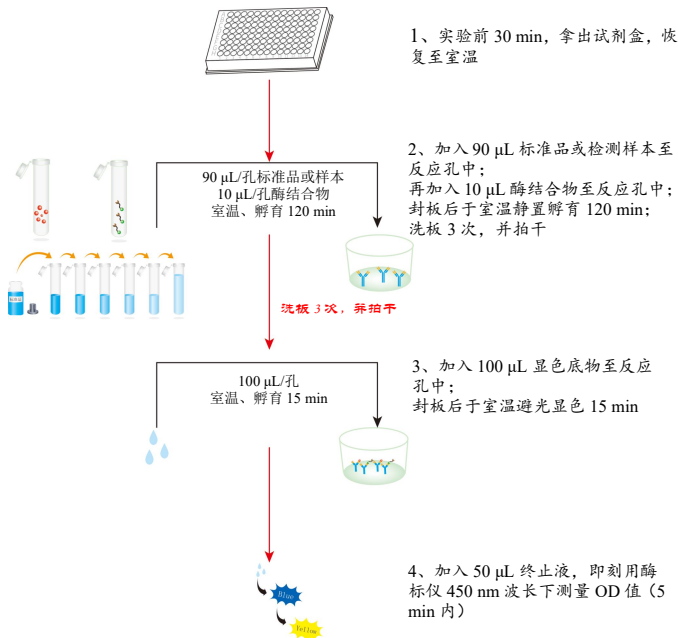
7. 加底物显色：每孔加入 100 μL 显色液，室温（ $25\pm 2^{\circ}\text{C}$ ）避光显色 15min。
- 提示：可根据实际显色情况酌情缩短或延长显色时间，但不可超过 30 min。当标准孔颜色出现明显梯度时，即可终止。提前 15 min 打开酶标仪预热。**

8. 加终止液：每孔加入 50 μL 终止液，终止液加入的顺序应尽量与显色底物加入的顺序相同。

提示：终止液加入后微孔板内液体的颜色由蓝色变为黄色。如果颜色呈现绿色或者颜色的变化明显不均匀，请轻轻叩击板框，水平充分混匀。

9. 检测读数：在 5 min 之内，使用酶标仪进行双波长检测，测定 450 nm 最大吸收波长和 630 nm 参考波长下的 OD 值。

操作流程图



※特别说明：显色时间需要根据实际显色情况酌情缩短或延长，但不可超过 30 min。当标准孔蓝色出现明显梯度时候（标准孔前 4 孔蓝色明显，后 4 孔蓝色不明显），即可终止。

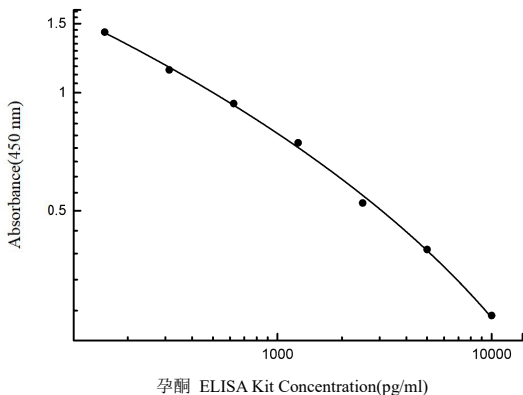
结果计算

1. 推荐使用酶标仪进行双波长检测，测定 450 nm 和 630 nm 波长下的 OD 值，并用 450 nm 的 OD 测定值减去 630 nm 的 OD 测定值。
2. 计算标准品、样品的平均 OD 值：每个标准品和样品的 OD 值应减去 0 孔的 OD 值。
3. 以标准品浓度为横坐标，吸光度 OD 值为纵坐标，用 Excel 或 ELISA Calc 软件绘制标准曲线（推荐使用四参数拟合），样品中孕酮含量可通过对应 OD 值由标准曲线换算出相应的浓度。（**相关软件及详细操作方法，如有疑问可联系公司技术支持**）
4. 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一些。
5. 如果样本进行了稀释，计算样本浓度时请乘以相应的稀释倍数。
6. 若样本 OD 值低于标准曲线下限，应做适当稀释后重新检测，计算浓度时再乘以稀释倍数。

典型数据

1. 数据和标准曲线

标准品浓度(pg/mL)	OD值1	OD值2	平均值
10000	0.243	0.297	0.27
5000	0.421	0.375	0.398
2500	0.520	0.526	0.523
1250	0.727	0.763	0.745
625	0.944	0.932	0.938
312.5	1.135	1.151	1.143
156.25	1.431	1.423	1.427
0	1.729	1.733	1.731



每次检测，每块酶标板都必须设立标准曲线，本图仅作为示例参考，应以当次试验标准品绘制的标准曲线计算孕酮的样本含量。

2. 灵敏度

最低可检测孕酮浓度达 10 pg/mL，20 个零标准品浓度 OD 的平均值加上两个标准差，计算相应的可检测浓度。

3. 特异性

可检测样本中的孕酮，且与其它类似化合物无明显交叉反应。

4. 重复性

板内，板间变异系数<10%。

5. 回收率

在选取的健康血清中加入不同浓度水平的孕酮，计算回收率。

样品	加入孕酮(ng/mL)	测量值(ng/mL)	回收率(%)
1	0	14	-
	5	20	105.3
	10	24.5	102.1
	20	33.8	99.41
2	0	21	-
	5	26.9	103.5
	10	31.6	101.9
	15	35.4	98.3

6. 孕酮正常值范围

下表是孕酮正常范围的参考值：

	ng/mL
女性卵泡期	0.15—0.70
女性黄体期	2.00—25.0
女性绝经期	0.06—1.60
妊娠期第一个三个月	10.3—44.0
妊娠期第二个三个月	19.5—82.5
妊娠期第三个三个月	65.0—229
男性成年	0.13—0.97
男性青春期前（儿童）	0.52—0.70

常见问题及解决方法

问题	可能原因	解决方法
高背景或阴性对照值偏高	洗板不充分	将洗涤液注入反应孔充分洗涤,彻底拍干孔中液体
	酶结合物过量	检查酶稀释度,按说明书标识的稀释度稀释
	底物污染	加底物前检查底物是否为透明无色,请勿用变蓝的底物,重新用新的底物试验
	阴性对照孔被阳性对照污染	注意洗涤时不要把洗液溢出孔外,不使阴阳对照孔液体连接一起
	不同批次试剂混用	检查试剂批号,请勿用不同批次试剂
显色信号弱	试剂过期	检查试剂盒有效期,请勿用过期试剂
	孵育时间过短	按说明书中规定的时间孵育
	试剂污染	检查试剂是否污染,请勿用污染的试剂
	酶标仪滤光片不匹配	检查酶标仪设置及滤光片是否匹配
	试剂盒平衡不充分	确保试剂盒试验前平衡至室温
无显色信号	显色时间不够	增加底物显色时间
	检测抗体、酶、或显色剂漏加	检查试验操作流程,重复试验
	酶被叠氮钠污染	请使用重新配制的试剂
标曲佳但样品孔无信号	试剂添加顺序有误	检查复核试验添加顺序、流程,重复试验
	样品中靶标物含量低或样品中无靶标物	设置阳性对照,重复实验
标曲佳但样品信号偏高	样品基质效应影响检测	重新稀释样品后复测
	样品中待检物含量超过标准曲线范围	重新稀释样品后复测
边缘效应	孵育温度不均衡	孵育时每步均使用新的封板胶纸,避免在环境温度变化大的地方孵育,勿叠放反应板

相关产品

产品名称	货号	规格	推荐等级
ELISA 套装(含 ELISA 通用稀释液/TMB 底物/浓缩洗涤液/终止液/封板胶纸/封闭液/包被液)	SEKF105	96T	★★★★★
无菌去离子水	F0020	100mL, 500mL	★★★★★
AFB1 ELISA Kit	SEKSM-0004	48T, 96T	★★★★★
DON ELISAKit	SEKSM-0007	48T, 96T	★★★★★
Clenbuterol ELISA Kit	SEKSM-0010	48T, 96T	★★★★★
Zearalenone ELISA Kit	SEKSM-0009	48T, 96T	★★★★★
Ractopamine ELISA Kit	SEKSM-0035	48T, 96T	★★★★★

发表优秀文献

[1] Bian L , Zheng M , Chang T , et al. Degradation of Aflatoxin B1 by recombinant laccase extracellular produced from Escherichia coli[J]. Ecotoxicology and Environmental Safety, 244.(IF7.129)

如需其他试剂盒组分或试剂盒，请联系北京索莱宝科技有限公司！！