

孕酮酶联免疫吸附测定试剂盒

Progesterone ELISA Kit

本产品冰袋运输; 保存于 4℃ (其中 **酶结合物** 需保存于 -20℃), 保质期 6 个月。

货号规格

HJ224 96次

产品简介

本试剂盒采用竞争法 **Elisa** 定量检测哺乳动物来源样品中孕酮的浓度。高特异性识别孕酮的抗体已经预包被于酶标板上, 同时加入样品和酶结合物(辣根过氧化物酶标记的孕酮), 样品中孕酮与酶结合物竞争性结合酶标板中包被的抗体。洗去游离的未结合的孕酮与酶结合物, 加入显色剂 **TMB**, 与抗体结合的酶结合物上连接的辣根过氧化物酶(**HRP**)就会催化 **TMB** 氧化生成蓝色物质, 而后加入终止液, 最终产物呈黄色。样品中孕酮含量越多, 与包被抗体结合的酶结合物就越少, 最终显色就越浅, 即产物颜色与样品中孕酮的浓度成反比。

背景简介

孕酮又名黄体酮, 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转变为分泌期, 为孕卵着床提供有利条件。孕酮产生途径如下: 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。体内孕酮绝大部分可在肝脏内被代谢为孕二醇, 与葡萄糖苷酸结合形成复合物, 然后通过肾脏排出体外。

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。在男性体内, 孕酮乃是产生皮质类固醇和雄激素的必需中间物; 而对于女性而言, 孕酮在月经周期的卵泡期间保持相对的恒定, 排卵后, 其浓度则迅速上升, 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** 小时降低至初始水平。在女性的妊娠期, 胎盘可以持续产生孕酮, 使得血清中的浓度达到 **10~20** 倍黄体期的孕酮水平。

产品内容

组分	体积或数量
孕酮抗体预包被板	12条
样品稀释液	16mL
孕酮标准品	2支
酶结合物(HRP标记的孕酮)	≥2支(冻干)
浓缩洗涤液(20×)	30mL
显色剂TMB	10mL
终止液	5mL
封板胶纸	3张

操作步骤

◆ 样品制备

1. 根据样品种类选择相应的处理方法:

- 血清样品:** 将全血在室温下静置 **0.5~2h**, 待其自然凝固并析出血清后, 离心取黄色上清即可(**4℃**, **1000~2000×g**, **10min**), 注意请勿吸取沉淀, 制备好的血清需置于冰上待用, 请勿在其中添加任何防腐剂或抗凝剂;
- 血浆样品:** 使用 **EDTA** 对全血进行抗凝处理后, 混合均匀置于冰上, 离心取黄色上清即可(**4℃**,

1000~2000×g, 10 min), 注意请勿吸取沉淀, 制备好的血浆需置于冰上待用;

注意: ① 样品在 2~8℃ 下保存请勿超过 24h, 如需长期存放(3 个月以上), 应冻存于-20℃。使用过程中请避免反复冻融;

② 若样品中孕酮的含量高于 10ng/mL, 请用 **样品稀释液** 稀释后再进行检测;

③ 请保证待测样品清澈透明, 检测前如发现样品中有悬浮物, 需通过离心去除;

④ 为了保证检测结果准确, 请勿使用溶血、黄疸、高血脂或污染的样品;

⑤ 一些影响代谢的药物、5-羟色胺(血管收缩素)和其它生物胺相对含量较高的饮食也会影响检测的结果。

◆ 检测准备工作

2. 试剂盒自冰箱取出后, 请置于室温平衡 20 min; 检测完成后, 剩余试剂请及时置于 4℃ 保存;

3. 将 **浓缩洗涤液(20×)** 用双蒸水或去离子水稀释为 1× 洗涤液;

4. 按 **酶结合物** 标签上注明的复溶体积, 在其中加入 **样品稀释液**, 室温操作, 请严格控制在 25~28℃, 静置 15~20 min 后轻轻混悬, 用移液器吹打数次, 使其彻底溶解;

注意: **酶结合物** 复溶后, 不能保存, 实验未用完的部分建议丢弃。

5. **孕酮标准品** 一管为 1mL, 浓度为 10ng/mL。按下表用 **样品稀释液** 倍比梯度稀释后依次加入检测孔中。(最高浓度为 10ng/mL, 将 **样品稀释液** 作为浓度 0ng/mL。)

管号	稀释液用量(μL)	复溶后标准品用量(μL)	标准品的最终浓度(ng/mL)
A	0	250	10
B	250	250	5
C	250	250(从 B 管中取)	2.5
D	250	250(从 C 管中取)	1.25
E	250	250(从 D 管中取)	0.625
F	250	250(从 E 管中取)	0.3125
G	250	250(从 F 管中取)	0.15625
H	250	0	0

◆ 检测流程

6. 通过计算确定一次实验所需的板条数, 取出所需板条放置于框架内, 多余的板条请放回铝箔袋密封, 保存于 4℃;

注意: ① 标准品和样品建议做双复孔检测;

② 建议设置本底校正孔, 即空白孔, 只需加入相应体积的 **显色剂 TMB** 和 **终止液** 即可;

③ 每次实验均需绘制标准曲线。

7. 将稀释后的样品和不同浓度标准品(90 μL/孔) 分别加入相应孔中;

注意: ① 请查阅相关文献确定样品中待检测蛋白的大致浓度, 若其大于或小于本试剂盒的最高或最低标准品浓度, 请将样品适当稀释或浓缩后再进行检测;

② 整个加样过程不宜超过 10min, 否则可能会影响检测结果。

8. 每孔再加入 10 μL 复溶后的 **酶结合物**, 充分混合 10s, 用封板胶纸封住反应孔, 室温(25~28℃) 避光孵育 120 min;

9. 洗板 3 次, 每孔 1× 洗涤液用量为 300 μL, 注入与吸出间隔 15~30 s, 洗完后将板倒扣在厚吸水纸上拍干;

注意: 洗涤过程至关重要, 洗涤不充分会导致结果产生较大误差。

10. 加入 **显色剂 TMB** (100 μ L/孔), 室温 (25~28 $^{\circ}$ C) 避光孵育 10~20 min;

注意: 在保存和使用时, 请勿将 **TMB** 接触氧化剂和金属。

11. 加入 **终止液** (50 μ L/孔), 混匀后即刻测量 OD450;

注意: 读取 OD 值建议在 10 min 内完成。

◆ 数据分析

12. 绘制标准曲线。以标准品浓度作横坐标, OD 值作纵坐标, 利用计算机软件生成标准曲线。通过样品的 OD 值即可在标准曲线上计算出其相应浓度。

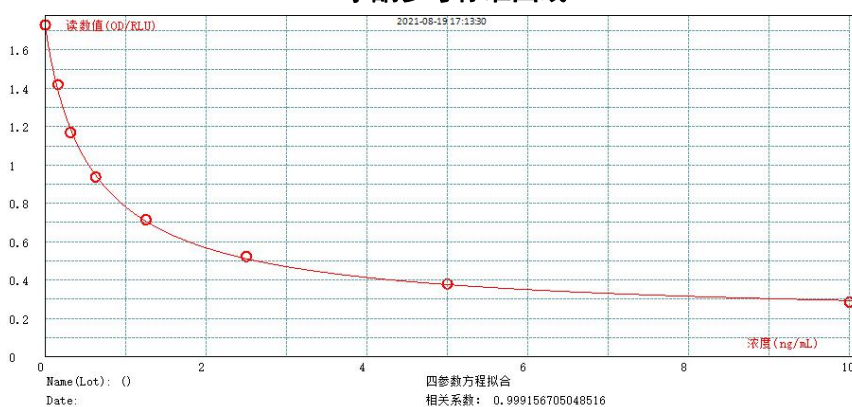
注意: ① 复孔 OD 值在 20% 的差异范围内结果才有效, 复孔 OD 值取平均后可作为测量值;

② 每个标准品或样品的 OD 值应减去本底校正孔的 OD 值;

③ 若样品 OD 值高于标准曲线上限, 应适当稀释后重测, 计算浓度时应乘以稀释倍数。

◆ 标准曲线范例

孕酮参考标准曲线



注意: 本图仅供参考, 应以同次试验标准品所绘标准曲线计算样品含量。

注意事项

1. **浓缩洗涤液** 低温情况下可能会出现结晶, 请水浴加热使结晶完全溶解后再配制工作液;
2. 严禁混用不同批号试剂盒的组分;
3. 实验操作过程中一定要保证试剂充分混匀, 否则会使结果产生较大误差;
4. 加样过程请避免产生气泡;
5. 为了您的安全和健康, 请穿实验服并戴一次性手套操作;
6. 本产品仅限科研使用。

相关性能参数

◆ 孕酮正常范围参考值

男子		ng/mL
成年		0.13~0.97
青春期前(儿童)		0.70~0.52

女子		ng/mL
卵泡期		0.15~0.70
黄体期		2.0~25.0
绝经后期		0.06~1.60

妊娠期	ng/mL
第一个三个月	10.3~44.0
第二个三个月	19.5~82.5
第三个三个月	65.0~229.0

◆ 特异性

本试剂盒对各种类似固醇类小分子化合物的交叉反应性见下表:

组分	交叉反应(%)
孕酮	100
孕烯醇酮	0.35
雌二醇	<0.1
17 α 羟基孕酮	0.3
雌三醇	<0.1
DHEA-S	<0.02
睾酮	<0.1
11-脱氧皮质酮	1.1
11-脱氧皮质醇	0.1
皮质醇	<0.02
皮质酮	<0.1
肾上腺酮	0.2

◆ 灵敏度

经重复验证, 本试剂盒最低可检测的孕酮浓度为 0.01 ng/mL。

◆ 回收率

在已知孕酮含量的正常人血清中加入一定浓度的孕酮。

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%