版本号： Datasheet-KE00976-A.0

生效日期： 2025-08-05

# 人CYP17A1双抗夹心ELISA检测试剂盒

请在实验前仔细阅读本说明书

| | |
|---|---|
| 产品货号： | KE00976 |
| 规 格： | 96T |
| 灵敏度： | 0.10 ng/mL |
| 检测范围: | 0.39-25 ng/mL |
| 用 途： | 此试剂盒用于定量细胞裂解液中的人CYP17A1浓度 |

本产品仅用于科学研究，不适用于临床诊断



USA: Proteintech@ptglab.com
UK & Europe: Europe@ptglab.com
China: Proteintech-CN@ptglab.com

# 目录

一：背景信息 ..... 3
二：检测原理 ..... 3
三：需自备的实验器材 ..... 3
四：试剂盒组分及储存 ..... 4
五：实验注意事项 ..... 4
六：样本准备 ..... 4
七：试剂准备 ..... 5
八：实验步骤 ..... 6
九：实验参数 ..... 7
9.1 参考标曲图 ..... 7
9.2 精密度 ..... 7
9.3 加标回收率 ..... 7
9.4 样本值 ..... 7
9.5 灵敏度 ..... 8
9.6 线性 ..... 8
9.7 特异性 ..... 8
十：参考文献 ..... 8

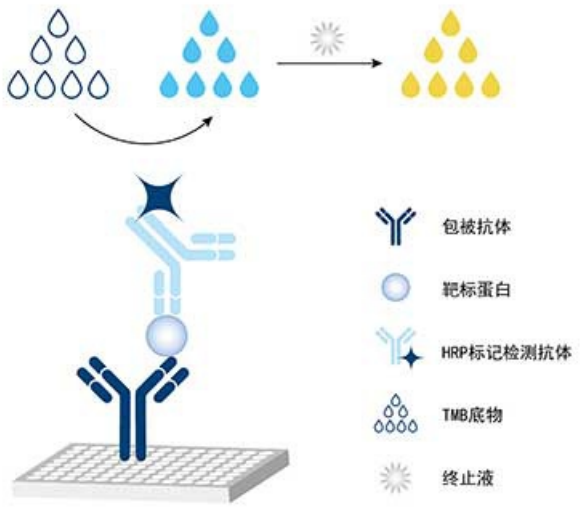


USA: Proteintech@ptglab.com
UK & Europe: Europe@ptglab.com
China: Proteintech-CN@ptglab.com

## 一：背景信息

细胞色素P450 17A1（CYP17A1）是一种关键的类固醇生成酶，对糖皮质激素和性激素的产生至关重要。该基因在肾上腺皮质和性腺中表达，但不在胎盘中表达。虽然CYP17A1已被证实是一种50 kDa的蛋白质，但先前研究在大鼠睾丸间质细胞中发现存在分子量更低（30 kDa）的免疫反应形式，可能是50 kDa酶的降解产物或截短形式。CYP17A1缺陷会导致5型肾上腺皮质增生症（AH5），同时该酶也是前列腺癌治疗中的重要抑制靶点。

## 二：检测原理




**◀双抗夹心模式图 (检测抗体直标HRP)**

按操作顺序形成抗体夹心结构后，加入TMB底物，板孔液体由无色变成蓝色，再加入终止液液体变为黄色后进行吸光度值测定。

## 三：需自备的实验器材

3.1 酶标仪 (可读取450 nm和630 nm双波长)；

3.2 高精度移液器及一次性移液器枪头；

3.3 洗板机 (亦可手动洗板)；

3.4 EP管 (用于稀释标准品及样本)；

3.5 吸水毛巾或滤纸 (用于拍干)；

3.6 烧杯和量筒；

3.7 用于ELISA实验的数据分析的统计拟合软件 (推荐四参数拟合方法)，如：Origin，ELISA Calc等。



USA: Proteintech@ptglab.com
UK & Europe: Europe@ptglab.com
China: Proteintech-CN@ptglab.com

## 四：试剂盒组分及储存

| 英文名称 | 中文名称 | 规格 | 数量 |
|---|---|---|---|
| Microplate | 预包被酶标板 - 96 孔板 | 8孔 × 12条 | 1 块 |
| Protein standard | 标准品 - 冻干粉状 * | 50 ng/瓶 | 2 瓶 |
| Detection antibody, HRP-conjugated (100×) | HRP标记检测抗体浓缩液（100×） ** | 120 uL/管 | 1 管 |
| Sample Diluent PT 1 | 样本稀释液 PT 1 | 30 mL/瓶 | 1 瓶 |
| Detection Diluent | 抗体稀释液 | 30 mL/瓶 | 1 瓶 |
| Wash Buffer Concentrate (20×) | 浓缩洗涤液（20×） | 30 mL/瓶 | 1 瓶 |
| Extraction Reagent | 裂解液 | 30 mL/瓶 | 1 瓶 |
| Tetramethylbenzidine Substrate (TMB) | 显色底物 TMB | 12 mL/瓶 | 1 瓶 |
| Stop Solution | 终止液 | 12 mL/瓶 | 1 瓶 |
| Plate Cover Seals | 封板膜 | | 4张 |
| **储存条件：**<br>1：未开启试剂盒可在2-8°C条件下存放6个月或者在-20°C条件下存放1年<br>2：已开启试剂盒可在2-8°C存放7天<br>3：每次实验均使用新的标准品,使用后丢弃 | | | |

* 使用对应的样本稀释液对标准品进行复溶，复溶过程避免产生气泡
** 开盖前请离心

## 五：实验注意事项

5.1 避免皮肤接触终止液以及TMB 显色液；

5.2 在实验过程中，注意穿戴个人防护装备，如实验服，手套，口罩和护目镜；

5.3 请勿将不同批次的试剂进行混用，过期产品请勿使用；

5.4 在使用自动洗板机时，板孔加入洗涤液之后，设置30秒的浸泡程序，以提高分析的精确度。

## 六：样本准备

6.1 细胞裂解液：收集细胞后，用预冷(2-8°C)的1×PBS洗3次，500×g离心5 min。细胞计数，离心弃上清；加PMSF至细胞裂解液中，终浓度为1 mM；按每1×$10^7$个细胞，加入1 mL细胞裂解液(含PMSF)，冰上裂解30 min，其间上下颠倒使裂解更充分，超声波破碎处理，8000×g-10000×g离心5 min，分离上清，分装后-80°C存放，并用BCA蛋白浓度测定试剂盒测定总蛋白浓度，避免反复冻融。



USA: Proteintech@ptglab.com
UK & Europe: Europe@ptglab.com
China: Proteintech-CN@ptglab.com

## 七：试剂准备

### 7.1 洗涤液（1×）：

如果洗涤液（20×）有晶体析出，37°C加热至晶体全部溶解。按1:20稀释倍数进行稀释：如取30 mL 浓缩洗涤液（20×），加入570 mL 超纯水或去离子水，得到洗涤液（1×）。

### 7.2 HRP标记检测抗体（1×）：

开盖前瞬时离心，按1:100比例进行稀释，稀释前根据预先计算实验所需的总量配制（100 uL/孔），实际配制时应多配制0.1-0.2 mL。如10 uL HRP标记检测抗体浓缩液（100×）加 990 uL **抗体稀释液**进行配制，轻轻混匀。

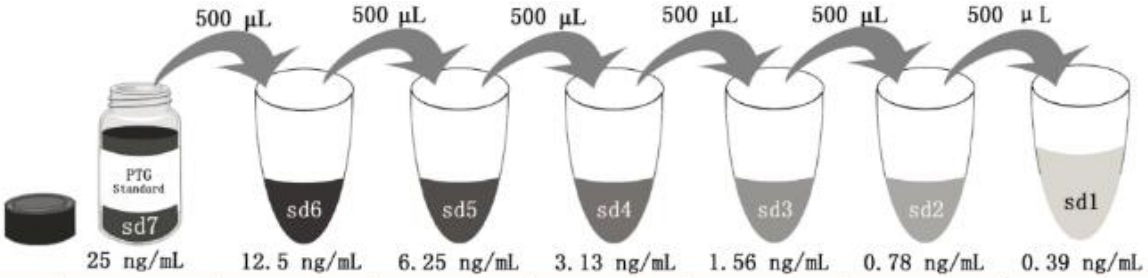
### 7.3 待检测样本：

不同的样本使用相应的样本稀释液进行稀释，如果样本检测值超过标曲最高范围，可将样本进行一定的稀释后再进行实验，使样本的检测值处于标曲范围内，不同样本的稀释倍数需自行优化。

稀释比推荐如下：细胞裂解液样本1:4或1:8稀释；样品采集、处理和储存的差异可能导致测值的改变。

### 7.4 梯度稀释的标准品：

使用2 mL PT 1样本稀释液复溶标准品，具体操作如下:




| | | | | | | | |
|---|---|---|---|---|---|---|---|
| Add # µL of Standard diluted in the previous step | — | 500 µL | 500 µL | 500 µL | 500 µL | 500 µL | 500 µL |
| # µL of Sample Diluent PT 1 | **2000 µL** | 500 µL | 500 µL | 500 µL | 500 µL | 500 µL | 500 µL |
| | "sd7" | "sd6" | "sd5" | "sd4" | "sd3" | "sd2" | "sd1" |



USA: Proteintech@ptglab.com
UK & Europe: Europe@ptglab.com
China: Proteintech-CN@ptglab.com

## 八：实验步骤

**实验前，需要将所需试剂在室温平衡20-30min（HRP标记检测抗体浓缩液不需要平衡室温，即用即取）；在进行标准品、样本以及不同试剂加样时，更换枪头，避免接触微孔板的内表面，不同的试剂，使用不同的加样槽。**

8.1 根据实验用量，取出需要用到的酶标板条，剩余板条加入干燥剂放入铝箔袋密封后存放于4°C，并于一周之内用完；

8.2 加样，分别设零孔、标准孔、待测样本孔。零孔加样本稀释液100 μL，余孔分别加梯度稀释的标准品或待测样本100 μL/孔，注意不要产生气泡（建议标准品和样本都做复孔，尽量避免实验误差，确保上样不间断，5-10 min完成加样）；

8.3 酶标板盖上覆膜，37°C孵育2 h；

8.4 洗涤

1） 揭开封板膜（动作轻柔，避免动作过大导致液体溢出串孔），弃液体，拍干；

2） 洗涤液（1×）洗涤板条，每孔350-400 μL，洗涤后，甩掉液体拍干板条，重复此步骤4次，避免异物进入板孔以及板条干燥；

8.5 每孔加100 μL HRP标记检测抗体（1×）(参照试剂准备部分7.2)，盖上封板膜，37°C孵育40 min；

8.6 重复步骤8.4；

8.7 显色：每孔加TMB显色液100 μL，37°C避光显色 15-20 min（如果颜色偏浅，可适当延长显色时间，不超过30 min；保持显色底物始终处于避光状态，显色底物在加样前应是无色透明，如有变色，请勿使用）；

8.8 终止：每孔加终止液100 μL，蓝色变黄色。终止液与TMB显色液的加样顺序一致；（注意：眼睛和皮肤避免接触终止液）

8.9 读数：以630 nm为校正波长，用酶标仪在450 nm波长测量各孔的光密度（OD值）。加入终止液后5 min内进行读数，若无630 nm波长，也可直接使用450 nm波长读数；

8.10 数据分析: 每个标准品和样本的OD值需减去零孔的OD值，设置复孔，取其平均值。以标准品的浓度为横坐标，OD值为纵坐标，使用专业软件（如Origin、ELISACalc等）进行四参数拟合（4-PL），根据样本的OD值由标准曲线推算出拟合浓度，乘以稀释倍数得到样本的实测浓度。

## 操作流程如下：

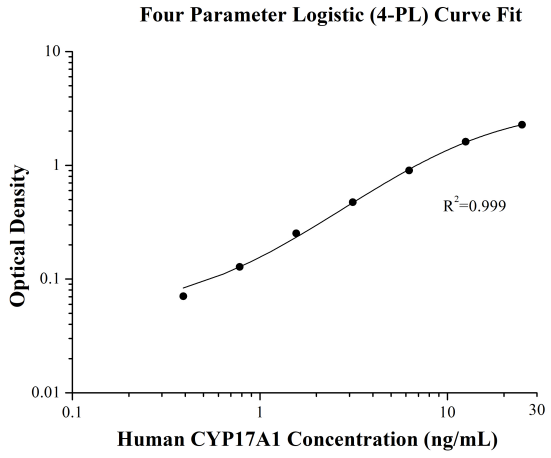
| 步骤 | 试剂 | 体积 | 孵育时间 | 洗涤次数 | 孵育温度 |
|---|---|---|---|---|---|
| 1 | 标准品或样本 | 100 μL | 120 分钟 | 4 次 | 覆膜后37°C孵育 |
| 2 | HRP标记检测抗体（1×） | 100 μL | 40 分钟 | 4 次 | 覆膜后37°C孵育 |
| 3 | 显色 TMB | 100 μL | 15-20 分钟 | 不需要洗涤 | 覆膜后37°C孵育，避光 |
| 4 | 终止液 | 100 μL | 0 分钟 | 不需要洗涤 | - |
| 5 | 加入终止液后以630 nm为校正波长，在450 nm处测量OD值，此过程建议不超过5分钟 | | | | |



USA: Proteintech@ptglab.com
UK & Europe: Europe@ptglab.com
China: Proteintech-CN@ptglab.com

## 九：实验参数

### 9.1 参考标曲图




| (ng/mL) | O.D | Average | Corrected |
|---|---|---|---|
| 0 | 0.0209<br>0.0205 | 0.0207 | - |
| 0.39 | 0.0886<br>0.0942 | 0.0914 | 0.0707 |
| 0.78 | 0.141<br>0.1556 | 0.1483 | 0.1276 |
| 1.56 | 0.271<br>0.2753 | 0.27315 | 0.25245 |
| 3.13 | 0.5062<br>0.4829 | 0.49455 | 0.47385 |
| 6.25 | 0.9288<br>0.9137 | 0.92125 | 0.90055 |
| 12.5 | 1.6381<br>1.6225 | 1.6303 | 1.6096 |
| 25 | 2.3346<br>2.255 | 2.2948 | 2.2741 |

### 9.2 精密度

板内精密度: 3个不同浓度的样本在板内重复测定 8 次;

板间精密度: 3个不同浓度的样本在板间重复测定 16 次。

| 板内精密度 (CV内) | | | | |
|---|---|---|---|---|
| 样本 | 数量 | 平均值 (ng/mL) | 标准差 | 变异系数CV% |
| 1 | 8 | 11.78 | 0.39 | 3.35 |
| 2 | 8 | 3.19 | 0.05 | 1.67 |
| 3 | 8 | 1.58 | 0.08 | 5.38 |

| 板间精密度 (CV 间) | | | | |
|---|---|---|---|---|
| 样本 | 数量 | 平均值 (ng/mL) | 标准差 | 变异系数CV% |
| 1 | 16 | 11.51 | 0.62 | 5.36 |
| 2 | 16 | 3.18 | 0.09 | 2.84 |
| 3 | 16 | 1.58 | 0.07 | 4.16 |

### 9.3 加标回收率

样本稀释后，在标曲范围内选择高、中、低3个浓度，进行人CYP17A1的加标回收率实验，结果如下：

| 样本类型 | 稀释倍数 | 平均值 (%) | 范围 (%) |
|---|---|---|---|
| 细胞裂解液 | 1:16 | 105 | 90-118 |

### 9.4 样本值

**细胞裂解液**

| | 人 CYP17A1 (ng/mL) | 总蛋白 (mg/mL) |
|---|---|---|
| A549 细胞裂解液 | 37.68 | 1.10 |
| Hela 细胞裂解液 | 26.60 | 1.20 |



USA: Proteintech@ptglab.com
UK & Europe: Europe@ptglab.com
China: Proteintech-CN@ptglab.com

## 9.5 灵敏度

用20个重复的零孔平均OD值加上两倍标准差得到的OD值带入标准曲线拟合出对应的浓度值，此试剂盒中人CYP17A1的灵敏度为0.10 ng/mL。

## 9.6 线性

用对应样本稀释液稀释样本，使稀释后的检测值处于标曲范围内，线性数据如下：

| | | 细胞裂解液 |
|---|---|---|
| 1:2 | 均值 (%) | 100 |
| | 范围 (%) | - |
| 1:4 | 均值 (%) | 109 |
| | 范围 (%) | 95-122 |
| 1:8 | 均值 (%) | 118 |
| | 范围 (%) | 105-127 |
| 1:16 | 均值 (%) | 81 |
| | 范围 (%) | 71-92 |

## 9.7 特异性

本试剂盒特异性识别天然和重组人CYP17A1。

## 十：参考文献


1. Burris-Hiday, Sarah D, and Emily E Scott. Molecular and cellular endocrinology vol. 528 (2021): 111261.
2. Missaghian, Elika et al. The Journal of endocrinology vol. 202,1 (2009): 99-109.
3. Liu, Ying et al. Molecular endocrinology (Baltimore, Md.) vol. 19,7 (2005): 1918-31.
4. Kostin, Vladimir A et al. Steroids vol. 115 (2016): 114-122.




USA: Proteintech@ptglab.com
UK & Europe: Europe@ptglab.com
China: Proteintech-CN@ptglab.com