

人雌二醇(E2)

酶联免疫吸附测定试剂盒

本试剂盒仅供体外研究使用，不用于临床诊断

- 货号: EKH005
- 检测范围: 0.78-50pg/mL
- 规格: 96T/48T
- 保存温度: 2-8℃
- 种属: 人
- 有效期: 6个月

1.E2简介

雌二醇 (Estradiol, E2), 亦称“动情素”、“求偶素”。化学式 $C_{18}H_{24}O_2$, 分子量为 272.38, 有 α , β 两种类型, 雌激素的一种。含量最多, 活性也最强。由卵巢内卵泡的颗粒细胞分泌, 其代谢物是雌酮及雌三醇。含 18 个碳原子。其靶器官为子宫、阴道、输卵管和垂体。可作为一种为经皮肤吸收的雌激素治疗剂。雌激素能促使细胞合成 DNA、RNA 和相应组织内各种不同的蛋白质。

2.检测原理

本试剂盒采用竞争法酶联免疫吸附试验 (ELISA)。往预先包被有人雌二醇(E2)抗原的微孔中, 依次加入样本、标准品、Biotin标记的抗体, HRP酶结合物, 中间经过温育和洗涤, 用底物TMB显色, TMB在过氧化物酶 (HRP)的催化下转化成蓝色, 并在酸的作用下转化成最终的黄色。颜色的深浅和样本中的人雌二醇(E2)呈负相关。用酶标仪在450nm波长下测定吸光度 (OD值), 计算样本浓度。

灵敏度: 0.35pg/mL

特异性: 可检测样本中人的E2, 且与其类似物无明显交叉反应。

3.试剂盒组成

名称	96孔配置	48孔配置	备注
预包被 96 孔酶标板 Pre-coated Assay Plate	8 孔×12 条	8 孔×6 条	无

标准品 Standard	2 支	1 支	按说明书 进行稀释
通用稀释液 Universal Diluent	2×20mL	1×20mL	无
浓缩Biotin-抗体100× Biotin-antibody (100×)	60μL	30μL	按说明书 进行稀释
浓缩酶结合物100× Streptavidin-HRP (100×)	120μL	60μL	按说明书 进行稀释
20×洗涤液 Wash Buffer (20×)	2×10mL	1×10mL	按说明书 进行稀释
底物 (TMB) TMB Substrate	10mL	5mL	无
终止液 Stop Solution	6mL	3mL	无
封板膜 Plate Sealer	4 张	4 张	无
说明书 Instruction Manual	1 份	1 份	无

4、检测中需要但没有提供而需要自备的材料：

1. 酶标仪 (450nm)
2. 高精度移液器及吸头：0.5-10μL、5-50μL、20-200μL、200-1000μL
3. 37℃恒温箱
4. 蒸馏水或去离子水

样本要求：

1. **试剂盒检测范围不等于样本中待测物的浓度范围**，建议实验前通过相关文献预估样本中待测物的浓度并通过预实验确定样本的实际浓度。如果样本中待测物浓度过高或过低，请对样本做适当的稀释或浓缩。

2. 若所检样本不在说明书所列样本类型之中，建议做预实验验证其检测有效性。
3. **血清**：将收集于血清分离管的全血样本在室温放置2小时或2-8℃过夜，然后1000×g离心20分钟，取上清即可，或将上清置于-20℃或-80℃保存，但应避免反复冻融。
4. **血浆**：用EDTA或肝素作为抗凝剂采集样本，并将样本在采集后的30分钟内于2-8℃1000×g离心15分钟，取上清即可检测，或将上清置于-20℃或-80℃保存，但应避免反复冻融。
5. **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的组织样本对应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。
6. **细胞培养物上清**：请1000×g离心20分钟，取上清即可检测，或将上清置于-20℃或-80℃保存，但应避免反复冻融。
7. **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150-200μL 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℃，1500×g离心10分钟，取上清检测。
8. **其它生物样本**：1000×g离心20分钟，取上清即可检测。
9. **样本外观**：样本应清澈透明，悬浮物应离心去除。
10. **样本保存**：样本收集后若在1周内进行检测的可保存于4℃，若不能及时检测，请按一次使用量分装，冻存于-20℃（1个月内检测），或-80℃（6个月内检测），避免反复冻融，样本溶血会影响最后检测结果，因此溶血样本不宜进行此项检测。

样本稀释方案：

请提前预估样本的浓度范围，如果您的检测样本需要稀释，参考稀释方案如下：

稀释 100 倍：一步稀释。取 5μL 样本到 495μL 通用稀释液内，做 100 倍稀释；

稀释 1000 倍：两步稀释。取 5μL 样本到 95μL 通用稀释液内，做 20 倍稀释，再取 5μL 20 倍稀释样本到

245 μ L 通用稀释液内，做 50 倍稀释，总共稀释 1000 倍；

稀释 100000 倍：三步稀释。取 5 μ L 样本到 195 μ L 通用稀释液内，做 40 倍稀释，再取 5 μ L 40 倍稀释样本到 245 μ L 通用稀释液内，做 50 倍稀释，最后取 5 μ L 2000 倍稀释样本到 245 μ L 通用稀释液内，做 50 倍稀释，总共稀释 100000 倍；

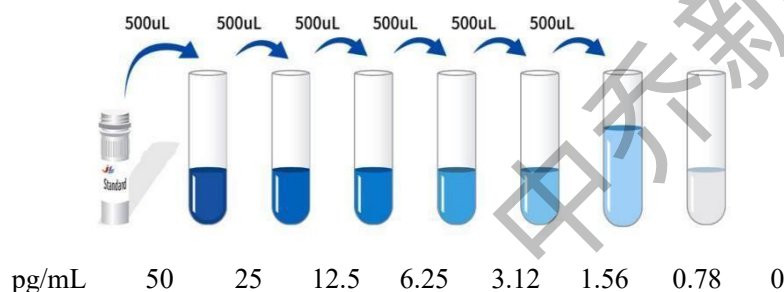
每步稀释时取液量不少于 3 μ L，稀释倍数不超过 100 倍。每步稀释都需混合均匀，避免起泡。

5. 检测过程

检测前准备工作：

1. 请提前 10 分钟从冰箱中取出试剂盒，平衡至室温。
2. **标准品梯度工作液配制：**加入 1mL 通用稀释液至冻干标准品中，静置 15 分钟待其完全溶解后轻轻混匀（浓度为 50pg/mL），然后按照以下浓度：50pg/mL、25pg/mL、12.5pg/mL、6.25pg/mL、3.12pg/mL、1.56pg/mL、0.78pg/mL、0pg/mL 进行稀释。

倍比稀释方法：取 7 支 EP 管，每管中加入 500 μ L 通用稀释液，50pg/mL 的标准品工作液中吸取 500 μ L 到第一支 EP 管中混匀配成 25pg/mL 的标准品工作液，按此步骤往后依次吸取混匀。最后一管直接作为空白孔，不需要再从倒数第二管中吸取液体，具体如下图。



3. **Biotin-抗体工作液配制：**使用前 15 分钟将 100 $\times$ 浓缩 Biotin-抗体于 1000 $\times$ g 离心 1 分钟，以通用稀释液将 100 $\times$ 浓缩 Biotin-抗体稀释成 1 $\times$ 工作浓度（例：10 μ L 浓缩液+990 μ L 通用稀释液），现配现用。
4. **酶结合物工作液配制：**使用前 15 分钟将 100 $\times$ 浓缩酶结合物于 1000 $\times$ g 离心 1 分钟，以通用稀释液将 100 $\times$ 浓缩酶结合物稀释成 1 $\times$ 工作浓度（例：10 μ L 浓缩液+990 μ L 通用稀释液），现配现用。
5. **1 $\times$ 洗涤液配制：**取 10mL 20 $\times$ 洗涤液到 190mL 蒸馏水中（从冰箱中取出的浓缩洗涤液可能有结晶，属于正常现象，可放置室温，待结晶完全溶解后再配制）。

6. 操作步骤：

1. 从室温平衡 10 分钟后的铝箔袋中取出所需板条，剩余板条用自封袋密封放回 4 $^{\circ}$ C。

2.加样：分别将样本或不同浓度标准品按照50 μ L每孔加入相应孔中，空白孔加入50 μ L通用稀释液，紧接着每孔加入50 μ L Biotin-抗体工作液。盖上封板膜后37 $^{\circ}$ C温育60分钟。（建议：将待测样本用通用稀释液最低稀释1倍后再加入酶标板内测试，从而减少基质效应对测试结果的影响，最后计算样本浓度时需乘以对应的稀释倍数。所有的待测样本和标准品在检测中建议设立复孔）。

3.洗板：弃去液体，每孔加入300 μ L 1x洗涤液，静置1分钟，甩去洗涤液，吸水纸上拍干，如此重复洗板3次（也可用洗板机洗板）。

4.加酶结合物工作液：每孔加入100 μ L酶结合物工作液，盖上封板膜后37 $^{\circ}$ C温育30分钟。

5.洗板：弃去液体按步骤3洗涤方法，洗板5次。

6.加底物：每孔加入90 μ L底物(TMB)，盖上封板膜，37 $^{\circ}$ C避光温育15分钟。

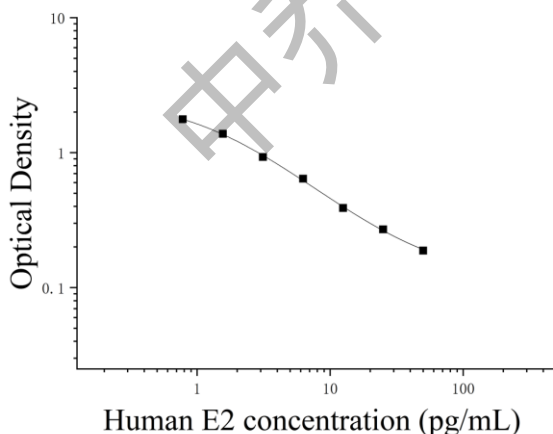
7.加终止液：取出酶标板，每孔直接加入50 μ L终止液，立即在450nm波长处测定各孔的OD值。

7、结果计算

结果判断：

1. 计算标准品和样本复孔的平均OD值。以浓度为横坐标，OD值为纵坐标，在双对数坐标纸上绘出四参数逻辑函数的标准曲线(作图时去掉空白组的值)。
2. 若样本 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。

典型数据和参考曲线：



注意：本图仅供参考，应以每次实验数据所绘制标准曲线计算样本含量。

8.试剂盒相关性能参数

1. 重复性：板内变异系数小于 10%，板间变异系数小于 10%。
2. 回收率：在选取的健康人血清、血浆和细胞培养上清中加入 3 个不同浓度水平的人E2，计算回收率。

样本类型	范围 (%)	平均回收率 (%)
血清(n=8)	81-101	96
血浆(n=8)	92-106	102
细胞培养上清(n=8)	97-108	105

3. 线性稀释：分别在选取的4份健康人血清、血浆和细胞培养上清中加入高浓度人E2，在标准曲线动力学范围内进行稀释，评估线性。

稀释比例	回收率 (%)	血清	血浆	细胞培养上清
1: 2	范围	83-95	88-96	90-110
	平均回收率	91	93	96
1: 4	范围	89-105	87-108	105-115
	平均回收率	94	98	110

9、注意事项

1. 严格按照规定的时间和温度进行温育以保证准确结果。所有试剂都必须在使用前达到室温 20-25℃。使用后立即冷藏试剂。
2. 洗板不正确可能导致不准确的结果。在加入底物前确保尽量吸干孔内液体。整个过程中不要让微孔干燥时间过长。
3. 清洁板底残留的液体和手指印，否则影响 OD 值。
4. 底物显色液应呈无色的颜色，已经变蓝的底物液不能使用。
5. 避免试剂和样本的交叉污染以免造成错误结果。
6. 在储存和温育时避免强光直接照射。
7. 任何反应试剂不能接触漂白溶剂或漂白溶剂所散发的强烈气体。任何漂白成分都会破坏试剂盒中试剂的生物活性。
8. 不能使用过期产品，不同货号 and 批号组分不得混用。
9. 试剂盒以外来源的重组蛋白可能会出现与本试剂盒抗体不匹配而不被识别的情况。
10. 如果可能传播疾病，所有的样本都应管理好，按照规定的程序处理样本和检测装置。