

大鼠雌激素（E）酶联免疫吸附测定试剂盒使用说明书

本试剂盒仅供体外研究使用、不用于临床诊断！

预期应用

ELISA 法定量测定大鼠血清、血浆或其它相关生物液体中雌激素含量。

实验原理

用纯化的雌激素抗体包被微孔板，制成固相载体，往微孔中依次加入标本或标准品、生物素化的雌激素抗体、HRP 标记的亲和素，经过彻底洗涤后用底物（TMB）显色。TMB 在过氧化物酶的催化下转化成蓝色，并在酸的作用下转化成最终的黄色。颜色的深浅和样品中的雌激素呈正相关。用酶标仪在 450nm 波长下测定吸光度（OD 值），计算样品浓度。

试剂盒组成及试剂配制

- 1、 酶标板：一块（96 孔）
- 2、 标准品（冻干品）： 2 瓶，请临用前 15 分钟内配制。每瓶以样品稀释液稀释至 1ml，盖好后室温静置大约 10 分钟，同时反复颠倒/搓动以助溶解，其浓度为 500 pg/ml，然后做系列倍比稀释（注：不要直接在板中进行倍比稀释），分别配制成 500 pg/ml，250 pg/ml，125 pg/ml，62.5 pg/ml，31.2 pg/ml，15.6 pg/ml，7.8 pg/ml，样品稀释液直接作为空白孔 0 pg/ml。如配制 250 pg/ml 标准品：取 0.5ml（不要少于 0.5ml）500 pg/ml 的上述标准品加入含有 0.5ml 样品稀释液的 Eppendorf 管中，混匀即可，其余浓度以此类推。
- 3、 样品稀释液：1×20ml。
- 4、 检测稀释液 A：1×10ml。
- 5、 检测稀释液 B：1×10ml。
- 6、 检测溶液 A：1×120 /瓶（1:100）。临用前以检测稀释液 A 1:100 稀释（如：10 检测溶液 A / 990 检测稀释液 A），充分混匀，稀释前根据预先计算好的每次实验所需的总量配制（100 /孔），实际配制时应多配制 0.1-0.2ml。

7、检测溶液 B: 1×120 /瓶 (1:100)。临用前以检测稀释液 B 1:100 稀释。稀释方法同检测溶液 A。

8、底物溶液: 1×10ml/瓶。

9、浓洗涤液: 1×30ml/瓶, 使用时每瓶用蒸馏水稀释 25 倍。

10、终止液: 1×10ml/瓶 (2 mol/L H₂SO₄)。

11、覆膜: 5 张

12、使用说明书: 1 份

自备物品

1、酶标仪 (建议仪器使用前提前预热)

2、微量加液器及吸头, EP 管

3、蒸馏水或去离子水, 滤纸

标本的采集及保存

1、血清: 全血标本请于室温放置 2 小时或 4 过夜后于 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。

2、血浆: 可用 EDTA 或肝素作为抗凝剂, 标本采集后 30 分钟内于 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。

3、其它生物标本: 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。

注: 以上标本均应密封保存, 4 保存应小于 1 周, -20 不应超过 1 个月, -80 不应超过 2 个月; 标本溶血会影响最后检测结果, 因此溶血标本不宜进行此项检测。

操作步骤

实验开始前, 各试剂均应平衡至室温, 试剂不能直接在 37 溶解; 试剂或样品配制时, 均需

充分混匀，混匀时尽量避免起泡。实验前应预测样品含量，如样品浓度过高时，应对样品进行稀释，以使稀释后的样品符合试剂盒的检测范围，计算时再乘以相应的稀释倍数。

1、 加样：分别设空白孔、标准孔、待测样品孔。空白孔加样品稀释液 100 ，余孔分别加标准品或待测样品 100 ，注意不要有气泡，加样 时将样品加于酶标板底部，尽量不触及孔壁，轻轻晃动混匀，酶标板加上盖或覆膜，37 温育 2 小时。为保证实验结果有效性，每次实验请使用新的标准品溶液。

2、 弃去液体，甩干，不用洗涤。每孔加检测溶液 A 工作液 100 （临用前配制），酶标板加上覆膜，37 温育 1 小时。

3、 弃去孔内液体，甩干，洗板 3 次，每次浸泡 1-2 分钟，大约 400 /每孔，甩干（也可轻拍将孔内液体拍干）。

4、 每孔加检测溶液 B 工作液（临用前配制）100 ，加上覆膜，37 温育 1 小时。

5、 弃去孔内液体，甩干，洗板 5 次，方法同步骤 3。

6、 每孔加底物溶液 90 ，酶标板加上覆膜 37 避光显色（反应时间控制在 15-30 分钟，当标准孔的前 3-4 孔有明显的梯度蓝色，后 3-4 孔梯度不明显时，即可终止）。

7、 每孔加终止溶液 50 ，终止反应，此时蓝色立转黄色。终止液的加入顺序应尽量与底物液的加入顺序相同。

8、 立即用酶标仪在 450nm 波长测量各孔的光密度（OD 值）。

注：

1、 试剂准备：所有试剂在使用前应平衡至室温，使用后请立即按照说明书要求保存试剂。实验操作中请使用一次性的吸头，避免交叉污染。

2、 加样：加样或加试剂时，第一个孔与最后一个孔加样之间的时间间隔如果太大，将会导致不同的“预温育”时间，从而明显地影响到测量值的准确性及重复性。一次加样时间（包括标准品及所有样品）最好控制在 10 分钟内。推荐设置复孔进行实验。

3、 温育：为防止样品蒸发，实验时将加上盖或覆膜的酶标板置于湿盒内，以避免液体蒸发；

洗板后应尽快进行下步操作，任何时候都应避免酶标板处于干燥状态；同时应严格遵守给定的温育时间和温度。

4、 洗涤：洗涤过程中反应孔中残留的洗涤液应在滤纸上拍干，勿将滤纸直接放入反应孔中吸水，同时要消除板底残留的液体和手指印，避免影响最后的酶标仪读数。

5、 试剂配制：Detection A 及 Detection B 在使用前请手甩几下或少时离心处理，以使管壁或瓶盖的液体沉积到管底。标准品、检测溶液 A 工作液、检测溶液 B 工作液请依据所需的量配制使用，并使用相应的稀释液配制，不能混淆。请精确 配制标准品及工作液，尽量不要微量配制（如吸取检测溶液 A 时，一次不要小于 10 μ l），以避免由于不准确稀释而造成浓度误差；请勿重复使用已稀释过的标准品、检测溶液 A 工作液、检测溶液 B 工作液。

6、 反应时间的控制：加入底物后请定时观察反应孔的颜色变化（比如，每隔 10 分钟），如颜色较深，请提前加入终止液终止反应，避免反应过强从而影响酶标仪光密度读数。

7、 底物：底物请避光保存，在储存和温育时避免强光直接照射。

洗板方法

1、 手工洗板方法：将推荐的洗涤缓冲液至少 0.4ml 注入孔内，浸泡 1-2 分钟，吸去（不可触及板壁）或甩掉酶标板内的液体，在实验台上铺垫几层吸水纸，酶标板朝下用力拍几次；根据需要，重复此过程数次。

2、 自动洗板：如果有自动洗板机，应在熟练使用后再用到正式实验过程中。

特异性

本试剂盒可同时检测重组或天然的大鼠雌激素，且与其它相关蛋白无交叉反应。

计算

各标准品及样本 OD 值扣除空白孔 OD 值后作图（七点图），如设置复孔，则应取其平均值计算。以标准品的浓度为纵坐标（对数坐标），OD 值为横坐标（对数坐标），在对数坐标纸上绘出标准曲线。推荐使用专业制作曲线软件进行分析，如 curve expert 1.3，根据样品

OD 值，由标准曲线查出相应的浓度，乘以稀释倍数；或用标准物的浓度与 OD 值计算出标准曲线的回归方程式，将样品的 OD 值代入方程式，计算出样品浓度，再乘以稀释倍数，即为样品的实际浓度。

检测范围： 7.8 pg/ml - 500 pg/ml，绘制标准曲线请取用以下浓度值：500 pg/ml，250 pg/ml，125 pg/ml，62.5 pg/ml，31.2 pg/ml，15.6 pg/ml，7.8 pg/ml。

最低检测限：3.9 pg/ml

说明

1. 在储存及孵育过程中避免将试剂暴露在强光中。所有试剂瓶盖须盖紧以防止蒸发和污染，试剂避免受到微生物的污染，因为蛋白水解酶的干扰将导致出现错误的结果。
2. 小心吸取试剂并严格遵守给定的孵育时间和温度。请注意在吸取标本 / 标准品，酶结合物或底物时，第一个孔与最后一个孔加样之间的时间间隔如果太大，将会导致不同的“预孵育”时间，从而明显地影响到测量值的准确性及重复性。而且，洗涤不充分将影响试验结果。
3. 试剂盒保存：部分试剂保存于-20℃，部分试剂保存于 2-8℃，具体以标签上的标示为准。
4. 浓洗涤液会有盐析出，稀释时可在水浴中加温助溶。
5. 刚开启的酶联板孔中可能会含有少许水样物质，此为正常现象，不会对实验结果造成任何影响。
6. 中、英文说明书可能会有不一致之处，请以英文说明书为准。
7. 所有的样品都应管理好，按照规定的程序处理样品和检测装置。
8. 有效期：6 个月