

human Estradiol ELISA

人雌二醇酶联免疫试剂盒

用于人血清，抗凝血浆中
雌二醇的检测

货号：A1010A0506

96 tests

仅供科研使用，勿用于药物、临床检测



联系地址：上海市徐汇区银都路 398 号 1 号楼 5 楼，

邮编：200231

联系电话：86 21 51692391，4008801880

web: www.biotnt.com

mail: lab@biotnt.com

1.检测原理：

本试剂盒为竞争法。未标记的雌二醇(存在于标准品、对照品和样品中)和酶标记的雌二醇偶联物之间发生竞争，竞争微孔板上数量有限的抗体结合位。洗涤和倾倒的程序可以去除未结合的物质。洗涤步骤后，加入酶底物。酶促反应通过加入终止液而终止。在酶标仪上测量吸光度，形成的颜色强度与样品中未标记的雌二醇的浓度成反比。通过一组标准品被用来绘制标准曲线，从中可以直接计算样品和对照组中的雌二醇含量。

2.背景：

雌二醇(1,3,5(10)-雌三烯-3,17 β -二醇；17 β -雌二醇；E2)是一种具有酚类A环的C18类固醇激素。这种类固醇激素的分子量为272.4。它是最有效的天然雌激素，主要由女性卵巢和胎盘的Graffian卵泡产生，少量由肾上腺和男性睾丸产生。

雌二醇(E2)被分泌到血液中，其中98%的雌二醇与性激素结合球蛋白(SHBG)结合，在较小程度上与其他血清蛋白如白蛋白结合。只有一小部分以自由激素或共轭形式循环。雌激素活性是通过雌二醇-受体复合物影响的，该复合物在目标部位的核水平上触发适当的反应。这些部位包括卵泡、子宫、乳房、阴道、尿道、下丘脑、垂体以及较小程度的肝脏和皮肤。

在月经周期正常的非怀孕妇女中，雌二醇的分泌遵循一个周期性的双相模式，最高浓度出现在排卵前。雌二醇浓度的上升被理解为在垂体水平上产生了积极的反馈影响，它影响了促性腺激素、卵泡刺激素(FSH)和黄体生成素(LH)的分泌，它们分别对卵泡成熟和排卵至关重要。排卵后，雌二醇水平迅速下降，直到黄体细胞变得活跃，导致雌二醇在黄体期出现二次温和上升和平稳。在怀孕期间，母体血清中的雌二醇水平显著增加，远远高于排卵前的峰值水平，并且在整个怀孕期间保持高水平。

3.试剂盒组份(2-8°C保存)

1. 酶标板(coated wells), 96 test, 12X8, 可分拆, 已经包被抗雌二醇抗体的酶标板;
2. 测定缓冲液(Assay buffer), 15 mL, 1 vial;
3. 标准品(standards)系列, 7只标准品, 标准品A 浓度 0pg/ml, 1ml; 标准品B 浓度 25pg/ml, 1ml; 标准品C 浓度 100 pg/ml, 1ml; 标准品C 浓度 250pg/ml, 1ml; 标准品D 浓度 500pg/ml, 1ml; 标准品E 浓度 1000pg/ml, 1ml; 标准品G 浓度 2000pg/ml, 1ml; 质控1, 质控2; 质控的结果, 请参考QC报告;
单位转换: 1pg/ml = 3.67 pmol/l
4. 酶联物, 14 mL, 1 vial;
5. 40 \times 浓缩洗涤液(Wash Buffer), 30 mL, 1 vial;
6. TMB 显色液, 14mL, 1 vial;
7. 终止液(Stop Solution), 14 mL, 1 vial;

4.未提供的试剂、仪器和耗材：

1. 单道或多道(8道或12道)移液器及移液器枪头: 10-200 μ L和50-1000 μ L;
2. 多道(8道或12道)移液器试剂存放槽;
3. EP管及试剂配置容器;
4. 圆柱形量筒: 100mL, 200mL, 500mL和1L;
5. 可在450nm处进行读数的酶标仪;
6. 洗瓶或自动洗板机;
7. 蒸馏水或去离子水;

8. 封板膜或板盖；
9. 乳胶手套；
10. 吸水纸；

5. 注意事项：

1. 为了成功地使用本试剂盒，用户应该对该试剂盒有一个全面的了解。只有严格和仔细地遵守所提供的说明，才能获得可靠的性能。
2. 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°C。使用后应立即冷藏保存试剂。
3. 每次运行都必须建立一条校准器曲线。
4. 对照组（包含在试剂盒中）应包括在每一次运行中，并落在既定的置信度范围内。
5. 洗板不正确可以导致不准确的结果。在加入底物前确保尽量吸干孔内液体。温育过程中不要让微孔干燥掉。
6. 消除板底残留的液体和手指印，否则影响 OD 值。
7. 底物显色液应呈无色或很浅的颜色，已经变蓝的底物液不能使用。
8. 避免试剂和标本的交叉污染以免造成错误结果。
9. 在储存和温育时避免强光直接照射。
10. 任何反应试剂不能接触漂白溶剂或漂白溶剂所散发出来的强烈气体。任何漂白成分都会破坏试剂盒中反映试剂的生物活性。
11. 标准孔及待测样本均建议做复孔，每次测定应同时做标准曲线，请合理安排预实验。
12. 不能使用过期产品。
13. 不要使用严重溶血、严重脂血、贫血或储存不当的血清。
14. 任何含有叠氮或硫柳汞的样品或对照血清都不能与本试剂盒兼容，因为它们可能导致错误的结果。
15. 只有校准品 A 可用于稀释任何高血清样品。使用任何其他试剂都可能导致错误的结果。
16. 在经常接触动物或动物产品的病人中出现的嗜异性抗体有可能对免疫学试验造成干扰。因此，如果怀疑出现错误结果，临床诊断应包括病人背景的所有方面，包括接触动物/产品的频率。
17. 建议所有客户准备自己的对照材料或血清池，在每次运行中应包括高和低水平，以评估结果的可靠性。
18. 当规定使用水进行稀释或重组时，请使用去离子水或蒸馏水。
19. 为了减少对潜在有害物质的接触，在处理试剂盒试剂和人体标本时应戴上手套。
20. 所有试剂盒的试剂和标本在使用前应达到室温并轻轻地但彻底地混合。避免反复冷冻和解冻试剂和标本。
21. 当对照组的检测值不能反映既定范围时，可能表明程序技术不当，移液不准确，清洗不彻底以及试剂储存不当。
22. 读取微孔板时，微孔中存在的气泡会影响光学密度（ODs）。在进行读数步骤之前，要小心地去除任何气泡。
23. 底物溶液（TMB）对光敏感，如果保存得当，应保持无色。不稳定或污染可通过出现蓝色表示，在这种情况下不应使用。
24. 在分配基质和停顿溶液时，不要使用这些液体会接触到任何金属部件的移液器。
25. 为防止试剂污染，使用新的一次性移液器吸头来分装每个试剂、样品、标准品和对照品。
26. 不要在一次测试中混合不同批号的试剂盒成分，不要使用超过标签上所印的有效期的任何成分。
27. 试剂盒必须被视为危险废物，并按照国家规定进行处理。

6. 安全性：

可能用于制备标准品和对照品的血清已经过测试，发现对乙肝表面抗原无反应，也已经过HCV和人类免疫缺陷病毒（HIV）抗体的测试，发现是阴性的。然而，没有任何一种测试方法可以完全保证不存在HIV、HCV和B型肝炎病毒或任何传染源。试剂应被视为潜在的生物危险，并以适用于任何血液标本的相同预防措施进行处理。

7. 化学危害

避免与含有TMB、过氧化氢和硫酸的试剂接触。如果接触到这些试剂中的任何一种，请用大量水清洗。TMB是一种可疑的致癌物。

8. 样本的采集：

1. 样本：本试剂盒可检测血清，抗凝血浆（EDTA，肝素锂或柠檬酸盐血浆）

注意：含有叠氮化钠的样品不应用于检测。

一般来说，应避免使用溶血性或脂血性标本。

血清：

通过静脉穿刺采集血液（如用血清采集管），使之凝固，并在室温下通过离心分离血清。在完全凝固之前不要进行离心分离。接受抗凝血剂治疗的捐赠者可能需要增加凝血时间。

抗凝血浆：

全血应收集到含有抗凝血剂的离心管中，收集后立即离心。

标本的储存和准备

标本应加盖，在检测前可在2°C至8°C下储存7天。保存时间较长（最长一年）的标本在检测前应仅在-20°C下冷冻一次。解冻后的样品在检测前应倒置数次。

标本稀释

人血清，抗凝血浆，初次检测，推荐不稀释；

如果在初次检测中，发现标本的含量超过了最高标准，可以用标准A稀释标本，并按照检测程序中的描述重新进行检测。

在计算浓度时，必须考虑到这个稀释系数。

举例：

a) 稀释1:10：10微升样品+90微升标准A（充分混合）

b) 稀释1:100：10微升稀释液 a) 1:10 + 90微升标准A（充分混合）

9. 试剂准备 :

1×洗涤液配制 :用蒸馏水 1 :40 倍稀释(示例 :1mL 40×浓缩洗涤液加入 39mL 蒸馏水,30ml 40×浓缩洗涤液加入 1170mL 蒸馏水);

10. 操作步骤 :

每次运行必须包括一条标准曲线。

1. 将所需数量的微滴孔固定在框架支架上。加样 :加入相对应标准品 ,待测样品各 25 μ L , 在每个孔中分配 100 μ l 酶结合剂 , 彻底混合 10 秒钟。封板 , 充分混匀 , 室温温育 90 分钟 ;
2. 洗板 : 用 1×洗涤液 每孔加入 400ul , 将反应板充分洗涤 3 次 , 在吸水纸上拍干 ; 洗板很重要 !
3. 每孔加入显色工作液 100 μ L , 将反应板置暗处室温 30 分钟 (可以目测实际显色情况 , 如显色过深 , 请及时终止);
4. 每孔加入 50 μ L 终止液 , 混匀 ;
5. 设置酶标仪主波长 450nm 副波长 630nm 检测吸光度 , 终止后在 10 分钟内读数。

11. 结果计算与判断 :

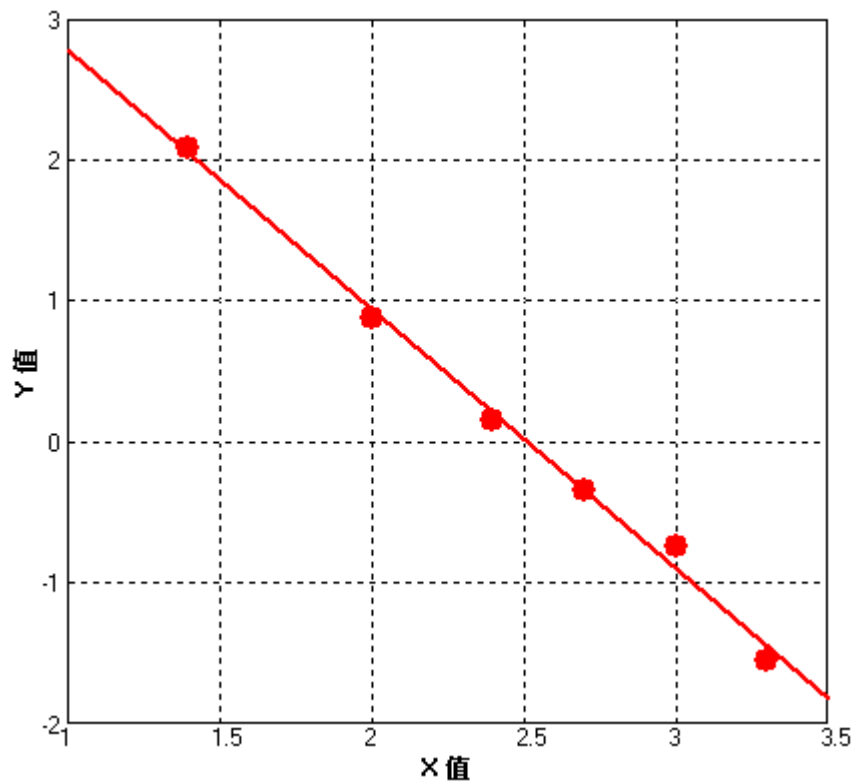
1. 计算每组标准品、对照品和样品的平均光密度 (OD) 值。
2. 使用半对数图画纸 , 通过将每个标准品获得的平均OD值与它的浓度绘制成标准曲线 , OD值在垂直 (Y) 轴上 , 浓度在水平 (X) 轴上。
3. 使用每个样品的平均OD值确定标准曲线的相应浓度。
4. 自动方法 : 使用说明中的结果是使用4参数曲线拟合自动计算的 。可以采用logistic 曲线拟合 (4参数) 拟合的方式 , 也可以采用logit-log的拟合方式。两者的数据拟合结果可能会得到略有不同的结果。
5. 样品的浓度可以直接从这个标准曲线中读取。浓度高于最高标准的样品必须进一步稀释或报告为>2000 pg/ml。在计算浓度时 , 必须考虑到这个稀释系数。

12. 典型标准曲线示例

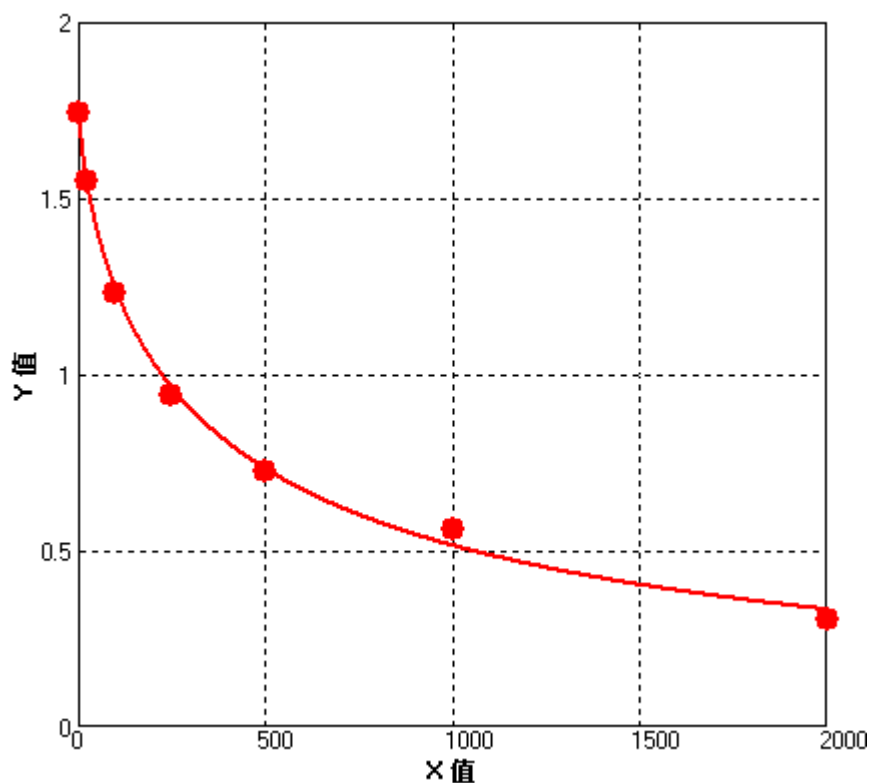
以下数据仅用于示例 , 不能代替实验时的实际数据。

标准品浓度	光密度 (450nm/630nm)
0 pg/ml	1.744
25 pg/ml	1.551
100 pg/ml	1.229
250 pg/ml	0.941
500 pg/ml	0.724
1000 pg/ml	0.562
2000 pg/ml	0.305

以下为 logit-log 拟合的曲线示例:



以下为 logistic 曲线拟合 (4 参数) 拟合的示意图 :



13.试剂盒特性：

13.1 试剂盒定量范围：

本试剂盒的定量范围为：10.6pg/ml-2000pg/ml；

13.2 试剂盒灵敏度 (Sensitivity)：

通过从标准零孔的 20 次重复分析的平均值中减去 2 个标准差来计算 ELISA 的分析灵敏度，确定是 10.6 pg/ml。

13.3 试剂盒数据批内差 (Intra-Assay)：

选取不同浓度的人血清样本各 3 例在同一次验证实验中加样 20 孔，来验证批内差，检测结果如下：

Sample	1	2	3
N	20	20	20

Mean (pg/mL)	92.5	144.4	340.7
Coefficient of Variation (%)	9.2	9.0	8.7

13.4 试剂盒数据批间差 (Inter-Assay) :

选取不同浓度的人血浆样本各 3 例在 40 次不同的实验中进行检测, 来验证批间差, 检

测结果如下 :

Sample	1	2	3
N	40	40	40
Mean (pg/mL)	151.3	336.7	661.4
Coefficient of Variation (%)	14.9	10.8	6.9

13.5 试剂盒数据特异性 (Specificity) :

下面是交叉反应率测试:

化合物	%交叉反应率
Estradiol-17 β	100
Androstenedione	0
Androsterone	0
Corticsterone	0
Cortisone	0
Dehydroepiandrosterone	0
11-Deoxycortisol	100
21-Deoxycortisol	0
Dihydrotestosterone	0
Dihydroepiandrosterone	0
20-Dihydroprogesterone	0
Epiandrosterone	0
16-Epiestriol	0
Estradiol-3-sulfate	0

Estradiol-3-gluconide	0
Estradiol-17a	0
Estriol	2.3
Estriol-16-gluconide	0
Estrone	6.9
Estrone-3-sulfate	0
Testosterone	0.05
Fulvestrant	3.8
11-Hydroxyprogesterone	0
17a-Hydroxyprogesterone	0
17a-Pregnenolone	0
17a-Progesterone	0
Pregnanediol	0
Pregnanetriol	2.3
Pregnenolone	0
Progesterone	6.9
Testosterone	0.05
Fulvestrant	3.8

13.6 干扰性物质

血红蛋白 (最高4毫克/毫升)、胆红素 (最高0.5毫克/毫升) 和甘油三酯 (最高7.5毫克/毫升) 对检测结果没有影响。

13.7 药物干扰

雌二醇ELISA不能用于正在接受药物氟维司群 (Faslodex®) 治疗的供体, 该药物在雌二醇ELISA中会发生交叉反应, 可能导致检测结果错误地升高。

13.8 高剂量 hook 效应

本竞争性试验中不存在高剂量-hook效应。