**雌二醇（E2）含量ELISA检测试剂盒**

**96T**

**请客户正式实验前做预实验确定样本稀释倍数！注意事项必读！**

**实验原理：**本试剂盒应用间接竞争法测定样本中雌二醇（E2）水平。用纯化的雌二醇标准品包被微孔板，制成固相抗原。样品中雌二醇与固相抗原竞争抗体，再利用HRP标记的二抗催化底物TMB显色。TMB在HRP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二醇（E2）呈负相关。用酶标仪在450nm波长下测定吸光度（OD值），通过标准曲线计算样品中雌二醇（E2）浓度。

雌二醇（Estradiol，E2）是雌激素的一种，其生物活性最强，由卵巢分泌。测定组织或排泄物中雌二醇的含量能直接为有关繁殖、掠夺、哺乳及极端环境下的生理行为提供科学依据。

**实验目的：**定量检测组织、水样、血清、血浆及相关液体样本中雌二醇（E2）含量。

**检测范围：**2-64 ng/mL

**样本处理及要求：**

1. 组织样品（鸡肉，鱼肉，虾肉，猪肉）：称取组织1g（鱼虾去皮取肉），加入1 mL PH7.4的PBS，充分研磨。5000 g/min，离心10分钟，收集上清，待测。
2. 水质样品：5000 g/min，离心10分钟，收集上清，直接检测。
3. 血清：血液室温自然凝固90分钟，离心10分钟（5000 g/min），收集上清，保存过程中如出现沉淀，应再次离心。
4. 血浆：应根据标本的要求选择EDTA、柠檬酸钠或肝素作为抗凝剂，混合10-20分钟后，离心10分钟（5000 g/min）。仔细收集上清，保存过程中如有沉淀形成，应该再次离心。

**操作步骤：**

1. 标准品的稀释与加样：向装有E2标准品的离心管中加入标签所示体积的无水乙醇，震荡溶解，即制得1 mg/mL的标准品母液。根据实验使用量用试剂盒中dilution buffer 1将母液稀释100倍成10 μg/mL，并再将其稀释到 128 ng/mL。设置浓度分别为128 ng/mL，64 ng/mL，32 ng/mL，16 ng/mL，8 ng/mL，4 ng/mL的标准曲线。标准曲线每个浓度设置两个重复，浓度稀释采用倍比稀释法。分别取6支EP管，分别编号1-6号标准品，取400 μL 128 ng/mL标准品加入6号标准品管，其余5管各加入200 μL dilution buffer 1。然后从6号标准品管取200 μL 128 ng/mL的标准品至5号标准品管混匀成64 ng/mL标准液，再从其中取出200 μL至4号标准品管混匀成32 ng/mL标准液，以此类推，从而得到128 ng/mL，64 ng/mL，32 ng/mL，16 ng/mL，8 ng/mL，4 ng/mL 6个浓度梯度的标准液。

即如表所示：

|  |  |  |
| --- | --- | --- |
| 128 ng/mL | 6号标准品 | 直接取400 μL稀释后的128 ng/mL标准品 |
| 64 ng/mL | 5号标准品 | 200 μL的6号标准品加入200 μL dilution buffer 1 |
| 32 ng/mL | 4号标准品 | 200 μL的5号标准品加入200 μL dilution buffer 1 |
| 16 ng/mL | 3号标准品 | 200 μL的4号标准品加入200 μL dilution buffer 1 |
| 8 ng/mL | 2号标准品 | 200 μL的3号标准品加入200 μL dilution buffer 1 |
| 4 ng/mL | 1号标准品 | 200 μL的2号标准品加入200 μL dilution buffer 1 |

2.  dilution buffer 2的配制：在标有dilution buffer 2的EP管中称取20 mg粉末，加入20 mL dilution buffer 1，震荡溶解。

3. 样品与一抗预结合（EP管中进行）：用dilution buffer 2将一抗稀释5000倍，分别设标准孔、待测样品孔、空白孔、对照孔。

**标准孔：**分别取130 μL上述6个浓度梯度的标准液与等体积用dilution buffer 2稀释后的一抗混合。

**待测样品孔：**130 μL样品与等体积用dilution buffer 2稀释后的一抗混合。

**空白孔：**取260 μL dilution buffer 1。

**对照孔：**取130 μL dilution buffer 1与等体积用dilution buffer 2稀释后的一抗混合。

将上述标准孔、待测样品孔、空白孔和对照孔EP管室温摇床温育40分钟。

4. 温育：将上述各管混匀后每孔加入100 μL，用封板膜封板后置37℃温育90分钟。

5. 洗涤：将50倍浓缩洗涤液washing buffer用蒸馏水50倍稀释后备用，弃酶标板中液体，吸水纸上拍干，每孔加入300 μL洗涤液，停留1min，弃液体，拍干。重复4次。

6. 加酶标二抗：用dilution buffer 2 5000倍稀释二抗，每孔加入100 μL，用封板膜封板后37℃温育60分钟。

7. 洗涤：将50倍浓缩洗涤液washing buffer用蒸馏水50倍稀释后备用，弃酶标板中液体，吸水纸上拍干，每孔加入300 μL洗涤液，停留1min，弃液体，拍干。重复4次。

8. 显色：每孔先加入TMB显色液 100 μL，混匀，37℃避光显色10-20 min。

9. 终止：每孔加终止液50 μL，终止反应（此时蓝色立转黄色）。

10. 测定：以空白孔调零，450 nm波长依序测量各孔的吸光度（OD值）。 测定应在加终止液后15分钟以内进行。

**计算：**

抑制率=【（A对照- A空白）-（A测定- A空白）】/ （A对照- A空白）\*100% = （A对照- A测定）/ （A对照- A空白）\*100%

以标准物的浓度为横坐标（由于实验中标准液与抗体等体积混合，所以真实的标准管浓度分别为64 ng/mL，32 ng/mL，16 ng/mL，8 ng/mL，4 ng/mL，2 ng/mL），以该浓度梯度为横坐标），抑制率为纵坐标，绘制对数标准曲线，根据标准曲线计算相应的样本浓度；除以回收率，再乘以稀释倍数，计算样品的实际浓度。

**若实验中偶然因素导致的标准曲线中出现跳跃点，应排除该点，不参与标准曲线的计算。**

**注意事项：**

1. 试剂盒从冷藏环境中取出应在室温平衡20分钟后方可使用，酶标包被板开封后如未用完，板条应装入密封袋中-20℃保存。
2. 因标准母液所用溶剂为无水乙醇，乙醇易挥发导致浓度变化，因此母液使用完毕后务必用封口膜密封并4 oC保存。
3. 样本处理前须知： 实验中必须使用一次性吸头，在吸取不同的试剂时要更换吸头。实验之前须检查各种实验器具是否干净，必要时可对实验器具进行清洁，以避免污染干扰实验结果。
4. 浓洗涤液可能会有结晶析出，稀释时可在水浴中加温助溶，洗涤时不影响结果。
5. 各步加样均应使用加样器，并经常校对其准确性，以避免试验误差。一次加样时间最好控制在5分钟内，如标本数量多，推荐使用排枪加样。
6. 请每次测定的同时做标准曲线，最好做复孔，实验方法中包含了两次重复，若增加重复次数，请相应调整。如标本中待测物质含量过高（样本OD值大于标准品孔第一孔的OD值），请先用样品稀释液稀释一定倍数（n倍）后再测定，计算时请最后乘以总稀释倍数（×n）。
7. 封板膜只限一次性使用，以避免交叉污染。
8. TMB显色液请避光保存。
9. 严格按照说明书的操作进行，实验结果判定必须以酶标仪读数为准。

**试剂盒性能：**

1. 样品线性回归与预期浓度相关系数R值为0.95以上。
2. 试剂盒保存：2-8℃，没用完的酶标板放入密封袋，-20℃保存。
3. 有效期：6个月。
4. 本试剂盒仅供研究使用。