

17 β -雌二醇定量分析酶联免疫检测试剂盒

- 仅供科学研究使用 -

- For reseach use only -

1. 简介

哺乳动物体内最重要的雌激素分别是雌二醇、雌激素酮和雌激素三醇。雌激素酮主要作为激素原出现，雌激素三醇的代谢产物主要是雌二醇。具有苯环 A 环的雌二醇[1.3.5(10)-estratriene-3,17 diol;17 estradiol; E2]属于 C18 类固醇激素，主要结合于球蛋白 (SHBG) 或血清白蛋白，只有 1-3%的雌二醇以游离形式循环在血浆中。雌二醇是最重要的天然雌激素，存在雌性哺乳动物和雄性哺乳动物体内。

对于人类的女性来说，雌激素刺激性器官的生长并产生第二性征，同时也影响促性腺激素的分泌；在男性中，雌二醇的作用尚未明确，可能具有调节促性腺激素的分泌的作用。对于未孕妇女，雌二醇主要由卵巢产生，当进入绝经期后，雌激素也由肝脏、大脑、肌肉及脂肪组织产生。

在排卵周期连续（如：每日）测定有助于精确评价卵泡生长等卵巢功能，也可用于检测在正常周期或在体外受精前人工诱导的排卵周期中雌激素血清水平的指数增长。此外，雌二醇的检测有助于判断雌激素缺乏，通常表现为青春期延迟，原发或继发性闭经，绝经等。对于正确的进行判别和诊断，还需要分析其它激素的水平。对促性腺激素浓度进行测定，可以找到雌激素缺乏的根源。如果浓度低于 30pg/ml，表明雌二醇相对缺乏。雌二醇的检测也有助于诊断女孩的性早熟。雌二醇浓度超过 1000pg/ml 的情况通常产生在妊娠妇女及雌激素分泌型肿瘤的病人身上。

2. 检测原理

17 β -雌二醇试剂盒采用竞争法检测原理。在酶标板预包被了高特异性识别 17 β -雌二醇的抗体，同时加入样本和 HRP 连接的 17 β -雌二醇结合物，样本中 17 β -雌二醇与 17 β -雌二醇结合物竞争性结合酶标板中包被的抗体。洗去游离的未结合的 17 β -雌二醇与 17 β -雌二醇结合物，加入 TMB 底物，与抗体结合的 17 β -雌二醇结合物上带的 HRP 就会催化底物 TMB 反应，颜色显蓝色，中止后显黄色。如果样本中 17 β -雌二醇含量越多，则与包被的抗体结合的 17 β -雌二醇结合物则越少，颜色则越浅，即颜色与样本中的浓度成反比。

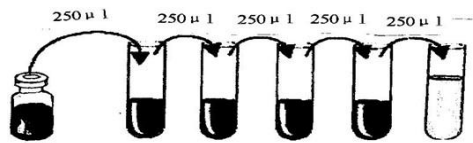
本试剂盒主要用于定量检测哺乳动物血清、血浆及细胞上清中的 17 β -雌二醇含量。

3. 试剂盒组成

3.1、预包被板 12 条/6 条(96T/48T)；

3.2、标准品 2/1 管 1(96T/48T)，每管 1m，浓度为 2000pg/ml；如用摩尔分数表示样本中的雌二醇浓度，可按下面公式转换：1pg/ml=3.67pmol/L

使用时直接取用稀释好的标准品为 2000pg/ml，作为最高浓度，再用样本稀释液倍比梯度稀释后依次加入检测孔中。（标准曲线取八个点，最高浓度为 2000pg/ml，样本稀释液直接加入作为 0 浓度。）



3.3、样本稀释液，1 瓶 16ml/8ml(96T/48T)；

标准曲线中 0 浓度标准品以样本稀释液直接加入。

34、冻干雌二醇 HRP 酶结合物，2 瓶/1 瓶(96T/48T)

35、TMB 底物溶液，1 瓶 10ml/5ml(96T/48T)；

36、中止液，1 瓶 5ml；

3.7、浓缩洗涤液 (20 \times)，1 瓶 30ml/15ml(96T/48T)；

3.8、封板纸 3 张/2 张(96T/48T)；

3.9、说明书一份；

4、检测中需要没有提供而需要自备的材料：

4.1、振荡混匀器。

4.2、可控温水浴箱 37°C。

4.3、ELISA 酶标仪（450nm）。

4.4、移液枪头等

5、注意事项

51、未开封的试剂应保存在 2—8°C。包装箱袋开封后，应立即封紧。开封后的包被微孔板储存在 2—8°C 下可以稳定 6 个星期。

52、所有试剂和所需的微孔板条在使用前应平衡至室温。

53、使用前将浓缩洗涤液用蒸馏水按 1：20 稀释（例如：10ml 浓缩洗涤液应用蒸馏水稀释至终体积 200ml）。

54、稀释后的洗涤液在 2—8°C 下可以保存 4 个星期。

55、样本收集 血清和 EDTA 处理的血浆样本。避免使用明显溶血、黄疸、脂血样本。使用的血清和 EDTA 血浆样本，按常规方法制备。样品在 2—8°C 下保存不超过 24 小时。如果样品需要长期存放（3 个月以上），应冻存在 -20°C。使用过程中应避免反复冻融。

56 如果样本中雌二醇的含量高于 2000pg/ml，应将样本用试剂盒提供的零浓度样本稀释液稀释后再进行检测。

57、一些影响代谢的药物及含有 5-羟色胺（血管收缩素）和其它生物胺相对含量较高的饮食也会影响检测的结果。

6. 检测过程

所有的试剂和样本在使用前应平衡至室温并摇匀（摇匀过程应保证无泡沫产生）。一旦检测开始，应连续操作，不中断。开始分析前，推荐准备好所有试剂，打开瓶盖，将所需微孔板条固定等等，以防止实验中不必要的时间拖延。使用每种试剂、标准品或样品时，都应更换一次性移液枪头，以免交叉污染。

7. 检测步骤

7.1、将所需微孔板条在微孔架上固定；

7.2、分别移取梯度稀释后 90ul 标准品以及样本至相应微孔中；整个加样时间间隔时间不宜超过 10 分钟，否则可能会影响检测结果。

7.3、提前用样本稀释液每瓶加 2.5ml 复溶 15~20 分钟，每孔加入 10ul 酶结合物，充分混合 10 秒钟。**25-28°C** 避光孵育 120 分钟。酶结合物复溶后，不能保存，未用完的剩余部分建议丢弃。

7.4、用洗涤液将微孔洗涤 3 次（推荐使用洗板机）。

重要提示：

如果是手工洗板，洗涤液加入板孔中，需浸泡 20~60 秒，最后一次必须在干净的吸水纸上用力拍打微孔，除去残留洗涤液。洗涤操作的正确与否将影响整个实验分析的灵敏度和精密度。

7.5、每孔加入 100ul 底物溶液。室温避光孵育 20 分钟（25-28°C）。

7.6、每孔加入 50ul 中止液，终止酶反应。并在 450nm 处测定 OD 值（参考波长 600—650nm）。读取 OD 值最好在 10 分钟内完成。

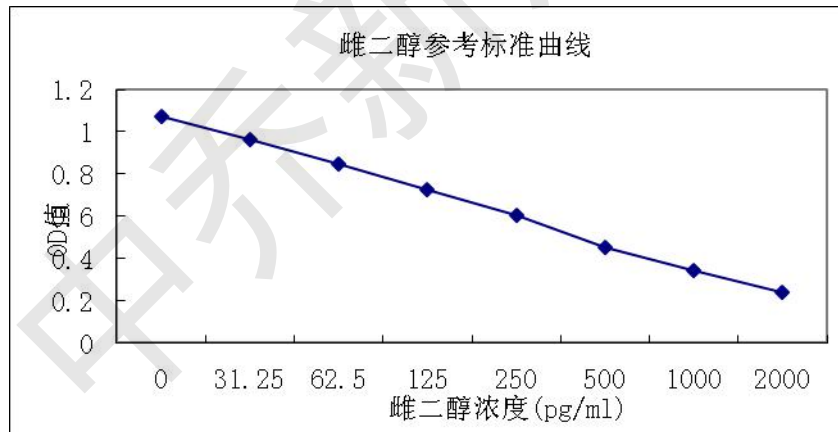
8、结果计算

在半对数图纸上，以标准品的浓度作为横坐标（对数刻度），对应的 OD 值作为纵坐标（线性刻度）。或者，以每个标准品对应的 OD 值除以零浓度对应的 OD 值，OD/OD₀，即结合率，作为纵坐标。如果使用软件绘图，采用 cubic spline, 4 参数（4 Parameter Logistics）或者 Logit-Log 曲线绘制标准曲线，可使曲线拟合的更好。样品浓度可以根据测得的 OD 值，直接从标准曲线上读取。

任何样品浓度如果高于最高标准品浓度，样品应用零浓度标准品作适当稀释后重新测量分析。所得结果乘以稀释倍数后即样品实际浓度。下表列出了雌二醇 ELISA 分析后的典型标准曲线，此数据仅供参考，不能代替任何时间所得的分析数据。

Standard (pg/ml)	OD 均值	典型 OD 值 1	典型 OD 值 2	平均 OD 值
0	1.086	1.058	1.072	0
31.25	0.975	0.957	0.966	31.25
62.5	0.856	0.834	0.845	62.5
125	0.742	0.71	0.726	125
250	0.617	0.593	0.605	250
500	0.459	0.443	0.451	500
1000	0.356	0.334	0.345	1000
2000	0.252	0.224	0.238	2000

下图是雌二醇参考标准曲线:



9. 试剂盒相关性能参数

9.1 雌二醇正常值范围

下表是雌二醇正常范围的参考值:

	n	pg/ml
正常女性 (>18 岁)		
卵泡期	34	30-120
排卵高峰	42	130-370
黄体期	29	70-250
绝经期	25	15-60
正常男性	95	15-60

9.2 特异性

本试剂盒对各种类似固醇类小分子化合物的交叉反应性见下表:

组分	交叉反应 (%)
17 β -雌二醇	100
雌激素酮	2.1
雌激素三醇	1.5
17 α -雌二醇	0.3
氢化可的松	<0.1
可的松	<0.1
妊娠素	<0.1
睾丸素	<0.1
DHEA-S	<0.1
5 α -二氢睾丸酮	<0.1

9.3 灵敏度

经重复验证, 本试剂盒最低可检测的雌二醇浓度为 12pg/ml。

9.4 回收率: 在已知雌二醇含量的正常人血清中加入一定浓度的雌二醇。

样品	加入雌二醇 (pg/ml)	测量值 (pg/ml)	回收率 (%)
1	0	34	
	89	96	69.7
	246	267	94.7
	315	369	106.3
2	0	32	
	89	97	73.0
	246	245	86.6
	315	363	105.1
3	0	183	
	89	245	134.8
	246	476	119.1
	315	557	118.1

参考文献

1. Wramsby, H. et al. Pregnancy rate in relation to number of cleaved eggs replaced after in vitro-fertilisation of stimulating cycles monitored by serum levels of estradiol and progesterone as sole index. Human Reproduction 2: 325-328(1987)