EK8103/2-BW1

Prostaglandin E2/PGE2 Competitive ELISA Kit

检测试剂盒（酶联免疫吸附法）

Catalog Number

EK8103/2 - 48

EK8103/2 - 96

定量检测血清、血浆和细胞培养上清中的前列腺素 E2 (PGE2)浓度。

本产品仅用于科学研究，非诊断试剂，不能用于临床诊断。

一、产品介绍

1. 背景介绍

前列腺素 E2 (PGE2)，也称为地诺前列酮，是一种可用作药物的天然前列腺素。PGE2 是催产药家族的药物。它通过结合和激活前列腺素 E2 受体，进而导致宫颈的开放和软化以及血管的扩张。它是一种直接的血管扩张剂，放松平滑肌，抑制交感神经末梢释放去甲肾上腺素。PGE2 还在海马突触可塑性和发热反应中发挥作用。此外，PGE2 还刺激肿瘤细胞增殖和分化以及肿瘤相关的新血管形成。PGE2 还抑制 T 细胞受体信号的传导，可能在炎症的消退中起到作用。

2. 检测原理

本试剂盒采用固相竞争酶联免疫吸附检测技术。兔抗小鼠抗体预包被在高亲和力的酶标板上。PGE2 特异性的单克隆抗体加入至孔中，经过孵育，与固相抗体结合。洗涤后，加入生物素标记的 PGE2 和未标记的 PGE2 或样本，竞争结合单克隆抗体上有限的结合位点。洗涤去除未结合的物质后，加入辣根过氧化物酶标记的链霉亲和素(Streptavidin-HRP)。洗涤后，加入显色底物，颜色反应的深浅与 PGE2 的浓度成反比。加入终止液终止反应，在 450 nm 波长(参考波长 570 - 630 nm)测定吸光度值。本试剂盒已验证人、小鼠和大鼠血清样本，但其它哺乳动物的 PGE2 预计也可被检测。

3. 试剂盒检测的局限

1) 请在本试剂盒标示的有效期内使用。
2) 试剂盒的试剂不能与其他批号的试剂或其他来源的试剂混合使用。
3) 任何标准品稀释、操作人员、移液技术、洗涤技术、孵育温度、试剂盒保存时间的改变，都将影响结合反应。
4) 本试剂盒在设计上去除或降低了生物学样本中的一些内源性干扰因素，并非所有可能的影响因素都已经去除。

二、基本信息

1. 试剂盒提供的材料

组分	编号	EK8103/2 - 48	EK8103/2 - 96
酶标板	EK801P	48T	96T
PGE2 抗体	EK8103A-48	1 vial	2 vials
PGE2 标准品	EK8103S1	1 vial	2 vials
PGE2 偶联物	EK8103S2	1 vial	2 vials
链霉亲和素	E0290-48	1 vial	2 vials
10×检测缓冲液	E0310	10 ml	10 ml
显色底物	E0230	6 ml	11 ml
终止液	E0300	11 ml	11 ml
20×洗液	E0281	50 ml	50 ml
封板膜	E0200	6	6

2. 未提供的材料设备

1) 能够检测 450 nm 吸光度的酶标仪，参考波长 570 nm 或 630 nm
2) 移液器及枪头、加样槽
3) 准备试剂用的试管、离心管、量筒等
4) 蒸馏水或去离子水
5) 涡旋振荡器、微孔板振荡器

3. 贮存

收到试剂盒后请按照试剂盒各组分标签上的保存温度分开保存，并在试剂盒有效期内使用。只有恰当保存的试剂才是有保证的。如果试剂盒的组分需要再次使用，请确保上一次使用之后没有被污染。

试剂盒名称	试剂盒各试剂分组		保存温度和保存时间
PGE2 试剂盒	组分 A	20×洗液 10×检测缓冲液 终止液 显色底物 封板膜	保存于 2 - 8℃， 大约可以贮存 1 个月。
	组分 B	PGE2 抗体 PGE2 标准品 PGE2 偶联物 辣根过氧化物酶标记的链霉亲和素 预包被酶标板	保存于-20℃，大约可以贮存 1 个月。未使用的板条请放回铝箔袋，封好封口。

4. 注意事项

1) 所有的化学试剂理应被认为具有潜在危害。
2) 推荐只有经过良好实验室培训的工作人员方可操作本试剂盒。操作时请佩戴合适的防护设施，例如白大衣、乳胶手套、安全眼镜等。
3) 请避免试剂接触皮肤和眼睛。如不慎接触，请立即用大量清水清洗。
4) 试剂盒中的终止液为酸性溶液，在使用终止液时，请佩戴防护服，及防护眼睛、手及面部的设施。
5) 本试剂盒用于科学研究，不能用于诊断治疗。
6) 请不要使用其他批号或其他来源的试剂替代本试剂盒中的试剂。
7) 请不要使用过期的试剂。
8) 在试剂盒的贮存或孵育过程请避免强光照射。
9) 在操作试剂盒或处理样本的区域请不要饮食。
10) 不要让试剂或样本接触皮肤和粘膜。
11) 在操作试剂盒或处理样本时请佩戴乳胶或一次性手套。
12) 显色底物避免与氧化试剂和金属接触。

13) 避免气溶胶的产生。
14) 为了避免微生物的污染，以及试剂与样本间的交叉污染，请使用一次性枪头。
15) 使用干净的容器配制试剂。
16) 暴露于酸性环境会抑制结合。
17) 试剂的准备必须使用蒸馏水或去离子水。
18) 显色底物在使用之前必须平衡至室温（25℃±3℃）。
19) 样本可能含有传染性病原体，处理样本和可能的污染材料的首选方法是 121.5℃，最少 1 小时。
20) 液体废弃物的处理。不含酸的液体废弃物，加入 1.0 %的次氯酸钠，浸泡 30 分钟。含酸的液体废弃物，请先中和，再加入次氯酸钠。
21) 有时标准品稀释液中可观察到蛋白沉淀，该沉淀不影响使用，可以忽略。或者可通过 6,000 × g 离心 5 分钟去除沉淀。

5. 技术要点

1) 重溶或者混合蛋白的时候，始终避免气泡产生。
2) 待 PGE2 标准品和 PGE2 偶联物充分解冻后再使用。
3) 避免交叉污染，在进行标准品加样、样本加样，以及不同试剂加样的时候，请更换枪头。不同的试剂，使用不同的加样槽。
4) 在应用自动洗板机时，加入洗液之后，设置 30 秒的浸泡程序，或者在不同的洗涤步骤将微孔板掉转 180 度，这样可以提高分析的准确度。
5) 为保证结果的精确性，孵育时封好封板膜。
6) 显色底物在添加之前应是无色的。保持显色底物始终处于避光态。
7) 终止液的添加顺序应与显色底物的添加顺序相同。
8) 添加终止液之后，底物的颜色应由蓝色转变为黄色。如果底物呈现绿色，说明终止液与显色底物没有充分混匀。
9) 推荐所有的检测样本和标准品在检测中设复孔。
10) 在任何情况下，避免接触微孔板的内表面。

三、 检测步骤

1. 样本采集与贮存

细胞培养上清

300 × g 离心 10 分钟去除沉淀物，即刻检测，或者分装，-20℃以下贮存。

血清样本

离心管收集血清。血样凝集 30 分钟后，1,000 × g 离心 10 分钟。吸取血清样本之后即刻检测，或者分装，-20℃以下贮存。

血浆样本

EDTA、枸橼酸钠或肝素抗凝收集血浆样本。1,000 × g 离心 30 分钟收集样本。即刻检测，或者分装，-20℃以下贮存。

本试剂盒可能适用于其它生物学样本。细胞培养上清、血清和血浆已经过验证。

注意：检测前，样本中可见的沉淀必须去除。不要使用严重溶血或高血脂的样本。样本应分装并贮存于-20℃，以避免 PGE2 活性的丢失。如果在 24 小时内检测。样本可以存放在 2 - 8℃。避免样本的反复冻融。在检测前，冷冻样本应缓慢地恢复至室温（25℃±3℃），轻柔地混匀。

为了抑制 COX-2 合成前列腺素，应在提取后立即将吲哚美辛加入血清和血浆收集管中(最终浓度约为 10 μg/ml)。

2. 样本准备

正常血清血浆样本需要 200 倍稀释。推荐 5 μl 样本 ＋995 μl 1×检测缓冲液。

3. 试剂准备

检测前请将所有的试剂、样本恢复至室温（25℃±3℃）。

如果浓缩的试剂出现结晶，37℃温浴，直至结晶全部溶解。

1×洗液

吸取 20×浓缩洗液 50 ml 至 1 L 的量筒，加蒸馏水至 1,000 ml，轻轻混匀，避免泡沫。转移至干净瓶内。2 - 8℃贮存，1×洗液可稳定保存 30 天。

1×检测缓冲液

吸取 10×浓缩检测缓冲液 10 ml 至 100 ml 量筒，加蒸馏水至 100 ml，轻轻混匀，避免泡沫。2 - 8℃贮存，1×检测缓冲液可稳定保存 30 天。

PGE2 抗体

开盖前短暂离心，用蒸馏水重溶 PGE2 抗体，重溶体积标注于标签上。重溶后静置 15 分钟。稀释前充分混匀。根据标准品和待测样本的数量，用 1×检测缓冲液按 1：50 稀释浓缩的 PGE2 抗体。

注意：请在 30 分钟内使用稀释后的 PGE2 抗体。

PGE2 偶联物

室温（25℃±3℃）下充分解冻后使用。开盖前短暂离心。

根据标准品和待测样本的数量，用 1×检测缓冲液按 **1：100** 稀释浓缩的 PGE2 偶联物。

注意：请在 30 分钟内使用稀释后的 PGE2 偶联物。

链霉亲和素

开盖前短暂离心，用蒸馏水重溶辣根过氧化物酶标记的链霉亲和素，重溶体积标注于标签上。重溶后静置 15 分钟。稀释前充分混匀。根据标准品和待检样本的数量，用 1×检测缓冲液按 **1：100** 稀释浓缩的辣根过氧化物酶标记的链霉亲和素。

样本稀释

为了保证实验成功，由于对样本的处理方式，培养条件等不同，建议首次使用本试剂盒前先进行一次预实验以摸索最佳的样本浓度，避免因过浓使显色反应超出酶标仪的检测上限或稀释倍数过大低于试剂盒灵敏度。 对于样本的稀释，请用 1×检测缓冲液稀释血清/血浆样本，用细胞培养基稀释细胞培养上清。

标准曲线的制备

室温（25℃±3℃）下充分解冻后使用。试剂盒提供的标准品浓度为 4,000 pg/ml。

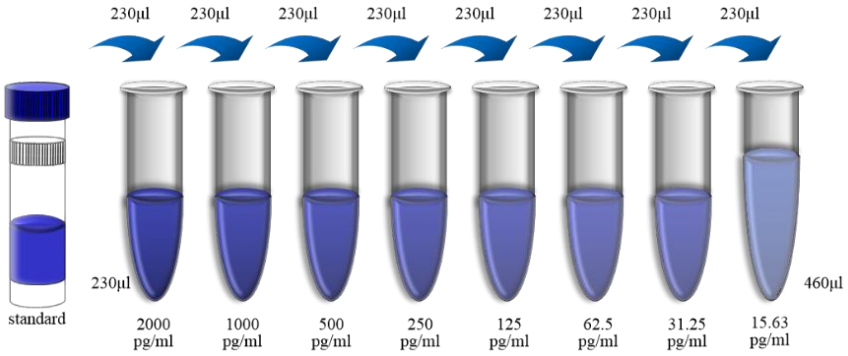
请使用聚丙烯管进行标准品稀释。

血清/血浆样本标准曲线的制备：

取 230 µl 浓缩的标准品，加入 230 µl 1×检测缓冲液，作为标准曲线的最高浓度 (2,000 pg/ml)。在每一个试管中加入 230 µl 1×检测缓冲液。使用高浓度标准品做 1：1 系列稀释。每次移液时，请确保充分混匀。以 1×检测缓冲液作为标准曲线的零浓度。

细胞培养上清样本标准曲线的制备：

取 230 µl 浓缩的标准品，加入 230 µl 细胞培养基，作为标准曲线的最高浓度(2,000 pg/ml)。在每一个试管中加入 230 µl 细胞培养基。使用高浓度标准品做 1：1 系列稀释。每次移液时，确保充分混匀。以细胞培养基作为标准曲线的零浓度。



4. 反应板设置

每块板或每批酶标条都须至少包含 2 个空白孔、2 个非特异性结合孔(NSB)、2 个最大结合孔(B_0) 以及 2 条包含 8 个点的标准曲线。

注意：为了确保准确、可重复的结果，每次检测都须包含以上设置。每个样本应做两个梯度的稀释，每个梯度做 2 次重复。为了统计的目的，我们建议每个样本做 3 次重复。

推荐的反应板设置和加样汇总如下所示。实验者可根据具体实验，更改孔的位置和类型。

组分 / 反应孔	1×检测缓冲液	PGE2 抗体	标准品	样本	PGE2 偶联物	SA-HRP
空白孔	-	-	-	-	-	-
非特异结合孔 (NSB)	50 µl + 100 µl	-	-	-	50 µl	100 µl
最大结合孔(B_0)	100 µl	50 µl	-	-	50 µl	100 µl
偶联物总酶活孔 (TA)	-	-	-	-	-	1 µl (加 TMB 前)
标准品孔	-	50 µl	100 µl	-	50 µl	100 µl
样本孔	-	50 µl	-	100 µl	50 µl	100 µl

Blank: background absorbance.

NSB (Non-Specific Binding): non-immunological binding to the well.

B_0 (Maximum Binding): maximum amount of the conjugate that the antibody can bind in the absence of free analyte.

TA (Total Activity): total enzymatic activity of the streptavidin-HRP.

5. 检测步骤

检测之前请将所有的试剂、样本平衡至室温（25℃±3℃）。

1) 准备好所有需要的试剂及工作浓度标准品。
2) 将不需要的板条拆卸下来，放回装有干燥剂的铝箔袋，重新封好封口。
3) **浸泡酶标板：**加入 300 µl 1×洗液静置浸泡 30 秒。为了获得理想的实验结果浸泡是必须的。弃掉洗液之后，在吸水纸上将微孔板拍干。洗板完成之后，请立即使用微孔板，不要让微孔板干燥。
4) **加抗体：除了 Blank、NSB 和 TA 孔**，其余每孔加入 50 µl 稀释的抗体(**1:50 稀释**)。NSB 孔加 50 µl 1×检测缓冲液。
5) **孵育：**使用封板膜封板。100-300 转/分钟振荡（保证每孔溶液不撒出且能充分混匀即可），室温（25℃±3℃）孵育 1.5 小时。
6) **洗涤：**弃掉液体，每孔加入 300 µl 洗液洗板，洗涤 6 次。每次洗板，在吸水纸上拍干。为获得理想的实验性能，必须彻底移除残留液体。
7) **加标准品：**标准品孔中加入 100 µl 系列稀释的标准品。样本孔中加入 100 µl 预稀释样本。NSB 孔加 100 µl 1×检测缓冲液，B_0 孔加入 100 µl 1×检测缓冲液(血清/血浆样本)或培养基(细胞培养上清样本)。(样本处理参考第 3 页“样本准备”)。
8) **加偶联物：除了 Blank 和 TA 孔**，其余每孔加入 50 µl 稀释的 PGE2 偶联物(**1:100 稀释**)。保证步骤 7 和 8 连续加样，不要间断。加样过程在 15 分钟内完成。
9) **孵育：**使用封板膜封板。100-300 转/分钟振荡（保证每孔溶液不撒出且能充分混匀即可），室温（25℃±3℃）孵育 2 小时。
10) **洗涤：**重复步骤 6。
11) **加酶孵育：除了 Blank 和 TA 孔**，每孔加入 100 µl 稀释的辣根过氧化物酶标记的链霉亲和素(**1:100 稀释**)。
12) **孵育：**使用新的封板膜封板。100-300 转/分钟振荡（保证每孔溶液不撒出且能充分混匀即可），室温（25℃±3℃）孵育 1 小时。
13) **洗涤：**重复步骤 6。
14) **加酶：**TA 孔加 1 µl 稀释的辣根过氧化物酶标记的链霉亲和素(**1:100 稀释**)。
15) **加底物显色：**每孔加入 100 µl 显色底物 TMB，避光，室温（25℃±3℃）孵育 5 - 30 分钟。

16) **加终止液：**每孔加入 100 µl 终止液。颜色由蓝色变为黄色。如果颜色呈现绿色或者颜色的变化明显不均匀，请轻轻叩击板框，充分混匀。

17)**检测读数：**在 30 分钟之内，使用酶标仪进行双波长检测，测定 450 nm 最大吸收波长和 570 nm 或 630 nm 参考波长下的 OD 值。校准后的 OD 值为 450 nm 的测定值减去 570 nm 或 630 nm 的测定值。仅使用 450 nm 测定会导致 OD 值偏高，并且准确度降低。

如何控制标曲显色？(仅针对双抗夹心法 ELISA 试剂盒)

5 - 30 分钟显色时间为经验范围，每个具体的实验，可根据以下情况，确定大致的显色时间：

1) 肉眼观察：标曲 S5 孔有淡蓝色、Blank 孔无明显蓝色时，即可终止；
2) 仪器判断：630 nm 左右波长下，标曲 S1 孔的 OD 值达到 0.5 - 0.7、S5 孔的 OD 值达到 0.05 - 0.08、Blank 孔的 OD 值小于 0.05 时，即可终止；
3) 高敏系列试剂盒因灵敏度更高，需严格控制显色时长，可较普通试剂盒适当缩短显色时间。

未尽事宜，请拨打联科生物技术支持热线 400-6721-600，获得更多帮助。

四、分析

1. 结果计算

计算标准品和样本的平均 OD 值，然后减去 NSB 的 OD 值。

以将标准品和样本的校准 OD 值除以 B_0 的校准 OD 值，乘以 100，计算得到% B/B_0。

将标曲中 S1 - S8 的% B/B_0 作为纵坐标，标准品 PGE2 浓度取对数后作为横坐标。选择最佳的曲线(如四参数)进行拟合。根据标曲，计算得到 PGE2 的浓度。

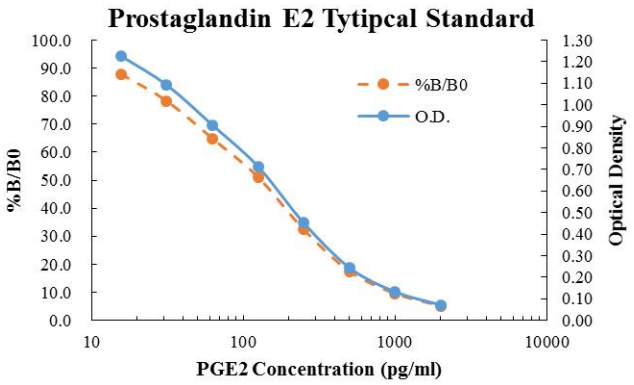
注意：标曲的计算不需要用到 Blank 和 TA 孔的 OD 值。它们是作为反应体系的诊断工具。

标准曲线最高浓度点的终浓度为 2,000 pg/ml。如果样本按照说明书进行了稀释，最终的稀释倍数为 200。如果样本进行了其它方式的稀释，计算样本浓度时请乘以相应的稀释倍数。

2. 典型数据

每次检测，每块酶标板都必须设立标准曲线。下面的标准曲线仅作为示例参考。

pg/ml	O.D.		Average	Corrected	%B/B0
NSB	0.073	0.076	0.075	-	-
B_0	1.460	1.481	1.471	1.396	-
15.63	1.261	1.340	1.301	1.226	87.79
31.25	1.137	1.197	1.167	1.092	78.22
62.50	0.975	0.986	0.981	0.906	64.86
125.00	0.792	0.785	0.789	0.714	51.11
250.00	0.529	0.527	0.528	0.453	32.45
500.00	0.307	0.333	0.320	0.245	17.55
1000.00	0.203	0.213	0.208	0.133	9.53
2000.00	0.139	0.154	0.147	0.072	5.12



3. 灵敏度

PGE2 的最低可检测浓度为 1.08 pg/ml (6 次独立实验的平均值)。

10 个零标准品浓度 OD 的平均值加上两倍 SD，计算最低可检测浓度。

4. 精密度

酶标板内精密度

3 个不同浓度的标准品酶标板内重复测定 20 次，评估酶标板内的精密度。

酶标板间精密度

3 个不同浓度的标准品酶标板间重复检测 6 次，评估酶标板间的精密度。

	酶标板内精密度				酶标板间精密度		
样本	1	2	3		1	2	3
	20	20	20		6	6	6
平均值 (pg/ml)	378.0	519.6	1122.4		385.6	534.6	1155.0
标准差	15.9	20.3	48.3		25.1	27.8	63.5
变异系数 (%)	4.2	3.9	4.3		6.5	5.2	5.5

5. 回收率

5 份健康血清中加入 3 个不同浓度水平的 PGE2，未加 PGE2 的血清作为本底，计算回收率。回收率的范围从 92 % 至 102 %，平均回收率为 99 %。

6. 稀释线性

5 份健康血清中加入高浓度的 PGE2，并在标准曲线的动力学范围内进行系列稀释，评估检测的线性。

	平均值 (%)	范围 (%)
1:2	98	94 - 101
1:4	95	93 - 99
1:8	93	92 - 102
1:16	97	95 - 101

7. 校准

本试剂盒的标准品为联科生物校准的高纯度重组 PGE2。

8. 样本值

应用本试剂盒，检测 30 份健康志愿者/ICR 小鼠/SD 大鼠的血清样本。

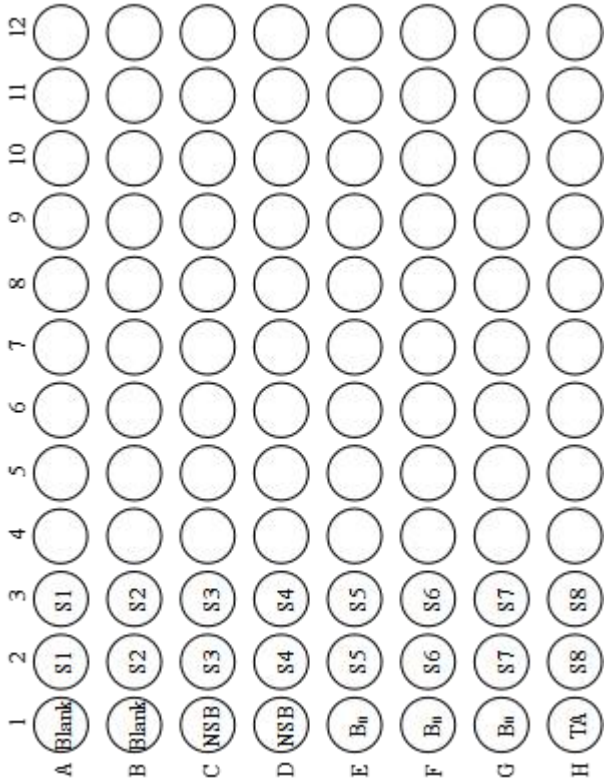
样本类型	检测样本数量	浓度范围 (ng/ml)	可测百分率 (%)	可测样本平均浓度 (ng/ml)
人血清	30	11.5 - 34.5	100	18.9
小鼠血清	30	15.6 - 56.7	100	32.5
大鼠血清	30	33.0 - 66.4	100	47.9

注意：此样本值范围非生理值范围。健康人/小鼠/大鼠样本的浓度范围因种属、样本制备以及检测人员、设备的不同而有所不同。以上数据仅供参考。

9. 特异性

复合物	交叉反应性
PGE3	14.5%
PGF2α	7.6%
PGF1α	7.4%
PGE1	5.3%
6-keto-PGF1α	4.2%
PGA2	0.55%
PGB1	< 0.1%
TXB2	< 0.1%
Arachidonic acid	< 0.1%

10. 排板布局



更多资讯和支持请关注联科生物公众号