Prostaglandin E2/PGE2 Competitive ELISA Kit
检测试剂盒（酶联免疫吸附法）说明书

【货号】EK8103

【包装规格】48T、96T

【预期用途】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。

【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。

【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。

【产品组成】

组分	编号	EK8103	EK8103
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

注：不同批号试剂盒中的组分不可以互换使用。如上述组分有任何损坏或遗失，请致电400-6721-600与我们的客服部门联系。未经授权或同意，我们不接受无理由的退货。

完成实验需要但未提供的：

1) 能够检测450 nm吸光度的酶标仪，参考波长570 nm或630 nm，涡旋振荡 器、微孔板振荡器；

2) 移液器及枪头、加样槽；试剂用的试管、离心管、量筒等；

3) 蒸馏水或去离子水；

【储存条件及有效期】

组分A：2-8℃保存，组分B：-20℃保存，失效日期参见试剂盒标签；

开封后试剂盒：链霉亲和素-20℃大约可贮存1个月；预包被酶标板-20℃大约可贮存1个月（未使用的板条请放回铝箔袋，封好封口）；PGE2标准品和PGE2偶联物-20℃大约可贮存1个月（重溶使用1次后丢弃）；其它组分在2-8℃大约可以贮存1个月。

【样本处理】

1) **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。

2) **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。

3) **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。

注意：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。

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℃，以避免待测物质活性的丢失。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。

【检测前准备】

1) **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。

2) **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。显色底物在添加之前应是无色的，请保持显色底物始终处于避光态。

“1×洗液”配制：吸取20×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”配制：吸取10×检测缓冲液5 ml至100 ml量筒，加蒸馏水至50 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抗体工作液”配制：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。

“PGE2偶联物工作液”配制：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。

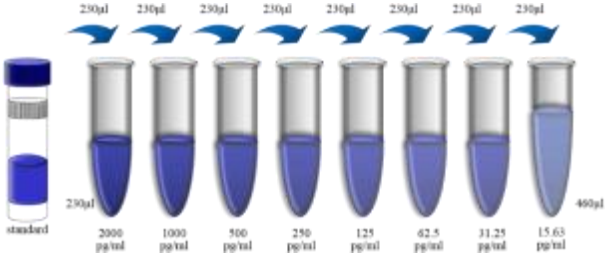
“链霉亲和素工作液”配制：开盖前短暂离心，用蒸馏水重溶链酶亲和素，重溶体积标注于标签上。重溶后静置15分钟。稀释前充分混匀。根据标准品和待检样本的数量，用1×检测缓冲液按**1：100**稀释链霉亲和素。

注意：PGE2抗体工作液、PGE2偶联物工作液、链霉亲和素工作液均应在30分钟内使用。

3) **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，避免因浓度过高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。

4) **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230µl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。



注：如若标准品发生部分潮解，此为保存条件变化所致，并不影响组分的使用。各组分稀释液中可能会观察到蛋白沉淀，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) **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

【检测方法】

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。**在任何情况下，避免接触微孔板的内表面。**

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 PGE2抗体 工作液(参见试剂准备)。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300µl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)。

8) 加偶联物：除了Blank和TA孔，其余每孔加入50 µl的PGE2偶联物 工作液(参见试剂准备)。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“链霉亲和素工作液”(参见试剂准备)。

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“链霉亲和素工作液”(参见试剂准备)。

15) 加底物显色：每孔加入100 µl显色底物，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。

终止液的添加顺序应与显色底物的添加顺序相同。

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。

【标准曲线示例】

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/B0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。

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/B_0
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

【局限性】

1) 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。

2) 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。

【注意事项】

1) 本试剂盒用于科学研究，不能用于诊断治疗。

2) 所有的样本和试剂理被认为具有潜在危害。实验时佩戴乳胶或一次性手套等防护措施。避免试剂直接接触皮肤和眼睛。如不慎接触，请立即用大量清水清洗。

3) 只有经过良好实验室培训的工作人员方可使用本试剂盒，请严格按照本说明书操作。

4) 为避免微生物的污染，以及试剂与样本间的交叉污染，请使用一次性枪头，不同的试剂，使用不同的枪头和加样槽；使用干净的容器配制试剂。

5) 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；请不要使用过期的试剂；在试剂盒的贮存或孵育过程请避免强光照射。

6) 显色底物避免与氧化试剂和金属接触；暴露于酸性环境会抑制结合。

7) 避免气溶胶的产生。

8) 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。

9) 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。

10) 推荐所有的检测样本和标准品在检测中设复孔。

【基本信息】

生产厂家：杭州联科生物技术股份有限公司

地址：浙江省杭州市萧山区闻堰街道时代大道4887号湘湖科创园15幢1层、2层

技术服务热线：**400-6721-600**

网址：www.liankebio.com