

Human Cortisol ELISA Kit

产品编号	产品名称	包装
PC169	Human Cortisol ELISA Kit	96次

产品简介:

- 碧云天的Human Cortisol ELISA Kit (Human Cortisol Enzyme-Linked ImmunoSorbent Assay Kit), 即人皮质醇酶联免疫吸附检测试剂盒, 是一种用于特异性地高灵敏地定量检测人血清、血浆、唾液及细胞培养上清液中的皮质醇的ELISA试剂盒。
- 本产品检测灵敏度高, 特异性强, 重复性好。多次重复检测结果表明, 最小检出量为78pg/ml, 与11-脱氧皮质醇的交叉反应性为0.9%, 与氢化泼尼松的交叉反应性为5.6%, 与皮质酮的交叉反应性为0.6%, 与脱氧皮质酮、孕酮、17-己酸羟孕酮、睾酮、雌三醇、达那唑等的交叉反应性小于0.1%板内、板间变异系数均小于10%。
- 皮质醇(Cortisol), 也称氢化可的松(Hydrocortisone)或化合物F (Compound F), 是从肾上腺皮质中提取的对糖类代谢具有最强作用的肾上腺皮质激素, 属于糖皮质激素的一种。皮质醇有多种作用, 但最为人所熟知的就是它对新陈代谢和免疫系统功能的影响。它是胆固醇的代谢物和其它类固醇激素如盐皮质激素、雌激素、雄激素和孕激素的前体。皮质醇水平由下丘脑-垂体-肾上腺轴(hypothalamic-pituitary-adrenal axis, HPA axis)控制。垂体前叶释放的促肾上腺皮质激素(adrenocorticotrophic hormone, ACTH)调控肾上腺皮质分泌皮质醇。ACTH的分泌受到促肾上腺皮质激素释放激素(corticotropin-releasing hormone, CRH)和精氨酸加压素(arginine vasopressin)等多肽的调控。而皮质醇对CRH的释放具有抑制作用。正常的皮质醇代谢遵循一种生理节奏, 是一个周期为24小时的循环, 一般皮质醇水平最高点在早晨约6-8点, 最低点在凌晨约0-2点。
- 大约由90%的皮质醇与结合蛋白相结合, 主要是皮质类固醇结合球蛋白(corticosteroid-binding globulin, CBG), 但是皮质醇一般在游离的条件下发挥生理效应, 也有一些证据表明CBG结合形式也可能作为一种生物介质。游离皮质醇穿过细胞膜进入胞浆, 与广泛表达的糖皮质激素受体(glucocorticoid receptor, GR)结合。虽然目前只有一个GR基因被鉴定出来, 但至少有两个选择性剪接的亚型(α 以及 β)存在并可能具有不同的表达模式和活动。一般认为, 激素/受体复合物作为二聚体进入细胞核, 在那里通过结合糖皮质激素反应元件(glucocorticoid response elements, GRE)调控转录。除了GR外, 皮质醇与盐皮质激素受体(mineralocorticoid receptor, MR)具有一定的亲和力, MR是醛固酮(aldosterone)的典型受体。
- 本试剂盒采用竞争法ELISA (Competitive ELISA)检测样品中Cortisol的浓度, 其原理见图1。高特异性识别Cortisol的抗体已预包被于酶标板上, 同时加入样品和辣根过氧化物酶标记Cortisol, 样品中的Cortisol与辣根过氧化物酶标记Cortisol竞争性结合酶标板中包被的抗体。随后洗去游离的Cortisol与游离的辣根过氧化物酶标记Cortisol。最后加入显色剂TMB溶液, 固相捕获的辣根过氧化物酶就会催化无色的TMB氧化成蓝色物质, 在加入终止液后呈黄色。如果样本中Cortisol含量越多, 则与抗体结合的辣根过氧化物酶标记Cortisol就越少, 颜色越浅, 即颜色与样品中的浓度成反比。通过酶标仪检测450nm处的吸光度值就能实现定量检测。Cortisol浓度与A450值呈正比, 通过绘制标准曲线, 对照样品吸光度值, 即可计算出样品中Cortisol浓度。

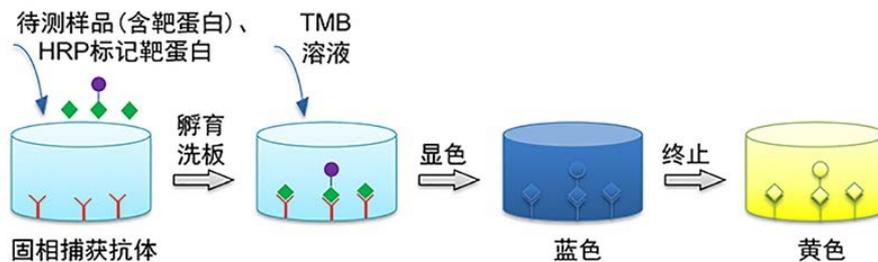


图1. 竞争法ELISA原理图。

- 一个包装的本试剂盒, 包括标准品检测, 可以进行96次检测。

包装清单:

产品编号	产品名称	包装
PC169-1	Cortisol抗体预包被板	8孔×12条
PC169-2	样品稀释液	16ml
PC169-3	Cortisol标准品	2-4瓶
PC169-4	辣根过氧化物酶标记Cortisol	2瓶

PC169-5	洗涤液(20X)	30ml
PC169-6	TMB溶液	10ml
PC169-7	样品酸化液	10ml
PC169-8	样品中和液	10ml
PC169-9	终止液	5ml
PC169-10	封板膜(透明)	2张
PC169-11	封板膜(白色)	2张
—	说明书	1份

保存条件:

标准品4℃保存, 1-2周内有效, -20℃保存6个月内有效, 试剂盒其它组分4℃保存6个月内有效。除标准品外, 试剂盒其它组分严禁冻存。

注意事项:

- 唾液中含有皮质醇, 所以建议实验时佩戴口罩和手套, 以免样品被污染。
- 由于标准品一般是冻干粉, 在制备后需要严格校准, 所以标准品的瓶数及每瓶标准品所需加入的稀释液体积请以实际收到的试剂盒及标准品标签上的标注为准。
- 洗涤液(20X)在低温下可能有结晶, 如果发现结晶, 请室温水浴加热使结晶完全溶解后再配制工作液。
- 为保证标准品的精确性, 标准品配制使用后, 如果有剩余请勿再次使用。
- TMB溶液请勿接触氧化剂和金属, 否则容易失效。
- 加样时, 请注意每个样品或标准品必须更换枪头, 一方面避免交叉污染, 另一方面也避免吸取体积的误差。
- 由于本试剂盒均经过独立测试, 所以请勿混用不同货号 and 不同批次的试剂盒组分, 即使是同种试剂盒不同批次的试剂盒组分也不能混用。多个试剂盒同时检测时, 请独立使用各个试剂盒中的试剂, 请勿使用不同试剂盒中相同名称的组分。
- 充分混匀对保证反应结果的精准性很重要, 在加液后请轻轻晃动整个96孔板, 以保证混匀。
- 本试剂盒很多操作在室温进行, 要求严格控制室温在25-28℃。温度低于25℃会导致最终检测到的吸光度显著下降。
- 洗涤过程非常重要, 洗涤不充分会使精确度下降并导致结果误差较大。
- 检测标准品和样品时建议设置重复孔, 以确保检测结果的可信度。
- 加样过程中须避免气泡的产生。
- 本产品仅限于专业人员的科学研究用, 不得用于临床诊断或治疗, 不得用于食品或药品, 不得存放于普通住宅内。
- 为了您的安全和健康, 请穿实验服并戴一次性手套操作。

使用说明:

1. 样品准备

- a. 样品的准备请按下列流程进行操作:
 - (a) 细胞上清样品离心取上清即可(如100-500×g, 5分钟)。
 - (b) 对于血清样品, 将全血在室温下放置30分钟至2小时, 不要剧烈摇晃以免溶血, 待全血自然凝固并析出血清后, 4℃约1000-2000×g离心10分钟, 取黄色上清即得血清, 注意不要吸取白色或淡黄色沉淀。制备好的血清需置于冰上待用。
 - (c) 对于血浆样品, 采集的全血建议使用EDTA进行抗凝处理, 混匀后置冰上, 4℃约1000-2000×g离心10分钟, 取黄色或淡黄色上清即得血浆, 注意不要吸取白色沉淀。制备好的血浆需置于冰上待用。
 - (d) 若待测样品不能及时检测, 样品制备后请分装, 冻存于-20℃或-80℃, 并注意避免反复冻融。
- b. 血清样品不应添加任何防腐剂或抗凝剂。
- c. 样品应清澈透明, 检测前样品中如有悬浮物应通过离心去除。
- d. 请勿使用溶血、高血脂或污染的样品检测, 否则结果将不准确。

2. 检测前准备工作

- a. 试剂盒从冰箱中取出后应置室温(25-28℃)平衡20分钟; 每次检测后剩余试剂请及时置于4℃保存。
- b. 配制适当量的洗涤液: 将洗涤液(20X)用双蒸水或去离子水稀释至1X, 例如10ml洗涤液(20X)加190ml水混匀后即为1X的洗涤液。
- c. 取5个洁净的1.5毫升离心管, 每管预先加入250μl的样品稀释液, 并参考图2进行标准品的倍比稀释, 最终得到10、5、2.5、1.25、0.625、0.3125ng/ml共六个标准品浓度, 最后将稀释好的标准品依次加入预包被板孔中, 样品稀释液直接加入作为0ng/ml浓度, 共七个标准品浓度。

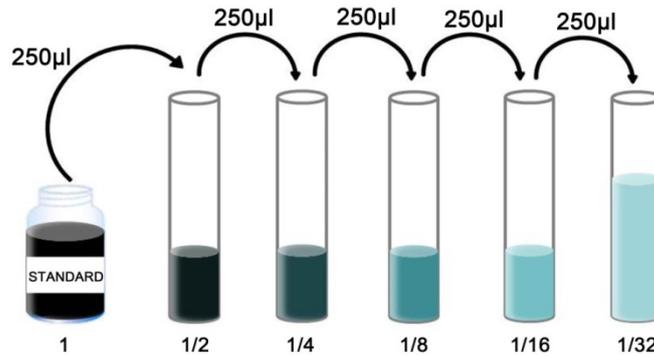


图2. 标准品倍比稀释示意图。按标准品(STANDARD)标签上标注体积加入样品稀释液溶解并混匀后的浓度为标准品的起始浓度。其它的倍比稀释后的浓度依次为起始浓度的1/2、1/4、1/8、1/16和1/32。

- d. 样本的酸化与稀释：细胞上清液样品一般需10倍稀释后检测，唾液样品一般需5倍稀释后检测。血清或血浆样品中的Cortisol需酸化将与蛋白结合的Cortisol释放出来再检测。本试剂盒提供样品酸化液进行酸化，提供样品中和液进行中和，检测时必须使用中和后的样本。标准品无需酸化。

血清或血浆样品的酸化与稀释：取100µl血清或血浆样品加入100µl样品酸化液，混匀后，25-28°C孵育15分钟，离心力大于12,000×g，离心4分钟，取上清100µl，再加入100µl样品中和液进行中和，此时样本已被稀释4倍。样品处理后的样品可再稀释20倍后再检测。请注意记录好样品的稀释倍数。

- e. 配制辣根过氧化物酶标记Cortisol溶液：按照标签标注体积，取样品稀释液至1瓶辣根过氧化物酶标记Cortisol中，置于25-28°C复溶15-20分钟。所需体积为“50µl×(标准品孔数+样品孔数)”。如果1瓶辣根过氧化物酶标记Cortisol配制后的体积不足所需体积，请使用更多瓶数的辣根过氧化物酶标记Cortisol，并在合并混匀后使用。**注：**辣根过氧化物酶标记Cortisol溶解后，不宜保存，未使用的剩余部分请丢弃。

3. 洗涤方法

自动洗板机或手工洗板：每孔洗涤液为300µl，注入与吸出间隔15-30秒。洗板5次。最后一次洗板完成后将板倒扣在厚吸水纸上适当用力拍干。

4. 实验过程需自备的材料和仪器

- 不同规格的移液枪及相应的吸头
- 酶标仪
- 自动洗板机(如果没有也可以手工洗板)
- 去离子水或双蒸水

5. 操作步骤

- 计算并确定一次实验所需的预包被板条数，取出所需板条放置在96孔框架内，暂时用不到板条请放回铝箔袋密封，保存于4°C。
- 每次实验都需配制标准品并绘制出标准曲线，同时建议设置本底校正孔，即空白孔，设置方法为该孔只加TMB溶液和终止液。
- 分别将样品或不同浓度标准品按照100µl/孔加入相应孔中，加样时间间隔不宜超过10分钟，否则可能影响检测结果。随后取辣根过氧化物酶标记Cortisol 50µl/孔加入各孔中，充分混匀。用封板膜(白色)封住反应孔，室温避光孵育120分钟。
- 洗板5次，且最后一次置于厚吸水纸上拍干。
- 加入显色剂TMB溶液100µl/孔，用封板膜(白色)封住反应孔，室温避光孵育15-20分钟。室温偏低时需要适当延长孵育时间，此时可以孵育至标准品和样品出现非常显著的颜色变化。
- 加入终止液50µl/孔，混匀后立即测量A450值。

6. 结果分析

- 复孔的值通常在20%的差异范围内结果才有效，复孔平均值可作为测量值。
- 每个标准品或样品的吸光度值应减去本底校正孔的吸光度值(如果没有做校正孔，则不需要减去)。
- 绘制标准曲线。以标准品浓度为横坐标，A450值为纵坐标，以平滑线连接各标准品的坐标点。通过样品的吸光度值和标准曲线计算出样品的相应浓度。

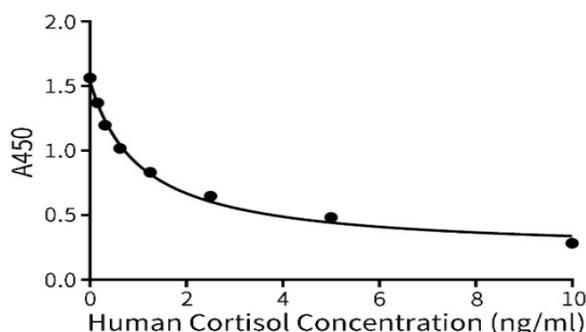


图3. Human Cortisol ELISA Kit的标准曲线。实测数据会因实验条件、检测仪器等的不同而存在差异，图中数据仅供参考。

d. 若样品OD值高于标准曲线上限，应适当稀释后重新测定，计算浓度时需注意乘以样品的稀释倍数。

相关产品：

产品编号	产品名称	包装
PA009	Human/Mouse/Rat ACTH ELISA Kit	96次
PC169	Human Cortisol ELISA Kit	96次

Version 2023.04.19