



EK8100-01

Cortisol Competitive ELISA Kit 检测试剂盒（酶联免疫吸附法）

Catalog Number

EK8100 - 48

EK8100 - 96

定量检测血清、血浆和细胞培养上清中的皮质醇(Cortisol)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

皮质醇，也称为醋酸氢化可的松或化合物 F，是糖皮质激素中的一种类固醇激素。在人类中，它由肾上腺中的肾上腺皮质束状带产生，在压力和低血糖时释放，可作为压力的一个生物标志物。皮质醇的产量与 ACTH 依赖的昼夜节律相关，在早晨达到峰值，随后逐渐降低。皮质醇在很多基质中可被检测到，如血液、粪便、尿液和唾液。血清中 90 - 95 % 的皮质醇与蛋白结合，包括皮质类固醇结合球蛋白和血清白蛋白。

皮质醇主要参与代谢和免疫。在代谢方面，它可促进糖异生、肝糖原沉积和降低葡萄糖利用率。在免疫方面，作为重要的抗炎因子，在过敏、免疫抑制和疾病抵抗中发挥重要作用。异常的皮质醇水平与许多状况有关，包括前列腺癌、抑郁症和精神分裂症。身体组织中皮质醇过高是库欣综合征的诱因。

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。皮质醇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，加入辣根过氧化物酶标记的皮质醇和未标记的皮质醇或样本，竞争结合单克隆抗体上有限的结合位点。在洗涤去除未结合的物质后，加入显色底物，颜色反应的深浅与皮质醇的浓度成反比。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，但其物种的皮质醇预计也可被检测。

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	EK8100 - 48	EK8100 - 96
预包被酶标板	EK801050P	48T	96T
皮质醇抗体	EK8100A	1 vial	1 vial
皮质醇标准品	EK8100S1	1 vial	1 vial
皮质醇偶联物	EK8100S2	1 vial	1 vial
标准品稀释液	E0260	5 ml	5 ml
解离试剂	E0306	10 ml	10 ml
10×检测缓冲液	E0310	10 ml	10 ml
显色底物 TMB	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

试剂盒保存于 2 - 8℃，有效期标注于标签上。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。

未开封试剂盒		贮存于 2 - 8℃。 请在有效期内使用。
打开的 试剂盒 或重组 试剂	1×洗液 1×检测缓冲液 终止液 标准品稀释液 底物 TMB 皮质醇抗体 皮质醇标准品 皮质醇偶联物	在 2 - 8℃， 大约可以贮存 1 个月。
	预包被酶标板	未使用的板条请放回铝箔袋，封好封口。在 2 - 8℃，大约可贮存 1 个月。

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（ $25^{\circ}\text{C} \pm 3^{\circ}\text{C}$ ）。
- 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°C ，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 $6,000 \times g$ 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) 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。
- 3) 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。
- 4) 为保证结果的精确性，孵育时封好封板膜。
- 5) 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。
- 6) 终止液的添加顺序应与显色底物的添加顺序相同。
- 7) 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。
- 8) 推荐所有的检测样本和标准品在检测中设复孔。
- 9) 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

$300 \times g$ 离心 10 分钟去除沉淀物，即刻检测，或者分装， -20°C 以下贮存。

血清样本

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

血浆样本

EDTA、枸橼酸钠或肝素抗凝收集血浆样本。 $1,000 \times g$ 离心 30 分钟收集样本。即刻检测，或者分装， -20°C 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°C ，以避免皮质醇活性的丢失。如果在 24 小时内检测。样本可以存放在 $2 - 8^{\circ}\text{C}$ 。

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（ $25^{\circ}\text{C} \pm 3^{\circ}\text{C}$ ），轻柔地混匀。

2. 样本准备

对于血清样本，需要预处理去除潜在的干扰蛋白和皮质醇结合蛋白。

- 1) 在离心管中加入 $100 \mu\text{l}$ 血清和 $100 \mu\text{l}$ 解离试剂，混匀。
- 2) 室温（ $25^{\circ}\text{C} \pm 3^{\circ}\text{C}$ ）孵育 15 分钟， $12,000 \times g$ 以上转速离心 4 分钟。
- 3) 小心吸取 $50 \mu\text{l}$ 上清至一新的离心管，加入 $950 \mu\text{l}$ $1 \times$ 检测缓冲液，混匀。

3. 试剂准备

检测前请将所有的试剂、样本恢复至室温（ $25^{\circ}\text{C} \pm 3^{\circ}\text{C}$ ）。

如果浓缩的试剂出现结晶， 37°C 温浴，直至结晶全部溶解。

1×洗液

吸取 $20 \times$ 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。 $2 - 25^{\circ}\text{C}$ 贮存， $1 \times$ 洗液可稳定保存 30 天。

1×检测缓冲液

吸取 $10 \times$ 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。 $2 - 8^{\circ}\text{C}$ 贮存， $1 \times$ 检测缓冲液可稳定保存 30 天。

皮质醇抗体

稀释前充分混匀。根据标准品和待测样本的数量，用 $1 \times$ 检测缓冲液按 **1: 100** 稀释浓缩的皮质醇抗体。

注意：请在 30 分钟内使用稀释后的皮质醇抗体。

皮质醇偶联物

网址: www.liankebio.com

客服电话: 400-6721-600

Cortisol Competitive ELISA Kit

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: 100 稀释浓缩的皮质醇偶联物。

注意：请在 30 分钟内使用稀释后的皮质醇偶联物。

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，请用试剂盒提供的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。**皮质醇标准品**

试剂盒提供的皮质醇标准品浓度为 150 ng/ml。本标准品含有有机溶剂。将标准品稀释前，用吸头吹打数次润湿吸头，以保证移液的准确性。

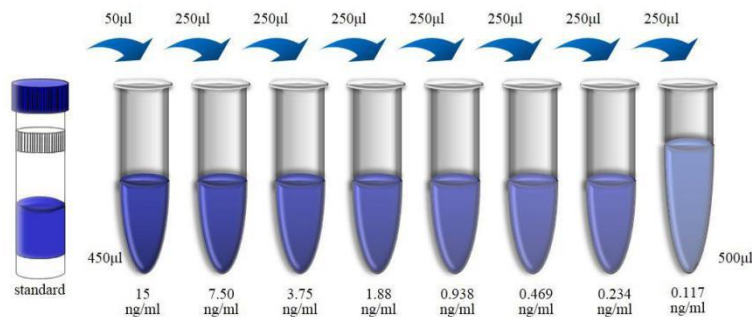
请使用聚丙烯管进行标准品稀释。

血清/血浆样本标准曲线的制作：

取 50 μ l 浓缩的皮质醇标准品，加入含 450 μ l 标准品稀释液的管中，作为标准曲线的最高浓度 (15 ng/ml)。在 7 个试管中每管加入 250 μ l 标准品稀释液。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。以标准品稀释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作：

取 50 μ l 浓缩的皮质醇标准品，加入含 450 μ l 无血清细胞培养基的管中，作为标准曲线的最高浓度 (15 ng/ml)。在 7 个试管中每管加入 250 μ l 无血清细胞培养基。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。以无血清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(B₀) 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。

反应孔 \ 组分	标准品稀释液	皮质醇抗体	标准品	样本	皮质醇偶联物
空白孔	-	-	-	-	-
非特异结合孔 (NSB)	100 μ l	-	-	-	50 μ l
最大结合孔(B ₀)	100 μ l	50 μ l	-	-	50 μ l
偶联物总酶活孔 (TA)	-	-	-	-	5 μ l (加 TMB 前)
标准品孔	-	50 μ l	100 μ l	-	50 μ l
样本孔	-	50 μ l	-	100 μ l	50 μ l

5. 检测步骤

检测之前请将所有的试剂、样本平衡至室温 (25°C \pm 3°C)。

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 μ l 1 \times 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：**除了空白、非特异性结合(NSB)和偶联物总酶活(TA)孔，其余每孔加入 50 μ l 稀释的皮质醇抗体。
- 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 $^{\circ}$ C \pm 3 $^{\circ}$ C）孵育 1.5 小时。
- 6) **洗涤：**弃掉液体，每孔加入 300 μ l 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 μ l 系列稀释的标准品。样本孔中加入 100 μ l 预处理样本。**非特异性结合 (NSB)和最大结合 (B₀) 孔**加入 100 μ l 标准品稀释液(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：**除了空白和偶联物总酶活(TA)孔，其余每孔加入 50 μ l 稀释的皮质醇偶联物。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 $^{\circ}$ C \pm 3 $^{\circ}$ C）孵育 2 小时。
- 10) **洗涤：**重复步骤 6。
- 11) **加偶联物：**偶联物总酶活(TA)孔加入 5 μ l 稀释的皮质醇偶联物。
- 12) **加底物显色：**每孔加入 100 μ l 显色底物 TMB，避光，室温（25 $^{\circ}$ C \pm 3 $^{\circ}$ C）孵育 5 - 30 分钟。
- 13) **加终止液：**每孔加入 100 μ l 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。
- 14) **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 孔的平均 OD 值。

将标准品和样本的校准 OD 值除以最大结合孔(B₀)的校准 OD 值，乘以 100，计算得到% B/B₀。

将标曲中 S1 - S8 的 % B/B₀ 作为纵坐标，标准品皮质醇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，计算得到皮质醇的浓度。

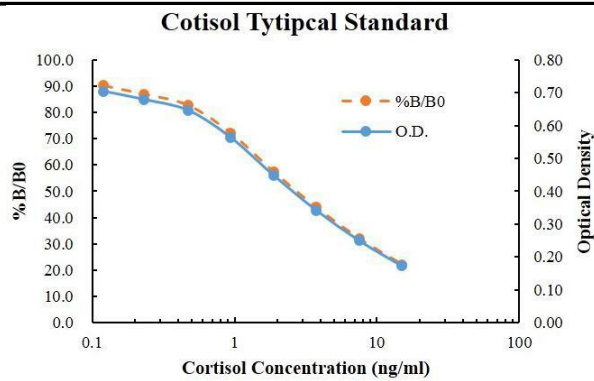
注意：标曲的计算不需要用到空白和偶联物总酶活(TA)孔的 OD 值。它们是作为反应体系的诊断工具。

标准曲线最高浓度点的终浓度为 15 ng/ml。如果样本按照说明书进行了稀释，最终的稀释倍数为 40。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。

ng/ml	O.D.	Average	Corrected	%B/B ₀
NSB	0.021	0.022	0.022	-
B ₀	0.800	0.804	0.802	0.781
0.12	0.732	0.719	0.726	0.704
0.23	0.697	0.705	0.701	0.679
0.47	0.669	0.667	0.668	0.646
0.94	0.579	0.591	0.585	0.563
1.88	0.469	0.471	0.470	0.448
3.75	0.362	0.366	0.364	0.342
7.50	0.266	0.278	0.272	0.250
15.00	0.194	0.195	0.195	0.173



3. 灵敏度

皮质醇的最低可检测浓度为 66.43 pg/ml (6 次独立实验的平均值)。

10 个零标准品浓度 OD 的平均值减去两倍 SD，计算最低可检测浓度。

4. 精密度

酶标板内精密度

3 个已知浓度的样本酶标板内重复测定 20 次，评估酶标板内的精密度。

酶标板间精密度

3 个已知浓度的样本酶标板间重复检测 6 次，评估酶标板间的精密度。

样本	酶标板内精密度			酶标板间精密度		
	1	2	3	1	2	3
	20	20	20	6	6	6
平均值 (pg/ml)	1146.5	3122.0	8249.1	872.4	2743.7	7585.6
标准差	52.6	143.5	354.5	63.5	213.3	485.5
变异系数 (%)	4.6	4.6	4.3	7.3	7.8	6.4

5. 回收率

5 份健康血清中加入 3 个不同浓度水平的皮质醇，未加皮质醇的血清作为本底，计算回收率。回收率的范围从 80 % 至 130 %，平均回收率为 118 %。

6. 稀释线性

5 份健康血清中加入高浓度的皮质醇，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	85	80 - 112
1:4	98	88 - 109
1:8	105	90 - 116
1:16	118	105 - 120

7. 校准

本试剂盒的标准品为联科生物校准的高纯度重组皮质醇。pg 转化为 pmol 的转换公式如下：1 pg/ml = 2.759 pmol/L。

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	47.5 - 157.4	100	104.6
小鼠血清	30	18.2 - 24.1	100	21.1
大鼠血清	30	11.4 - 31.2	100	23.4

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。

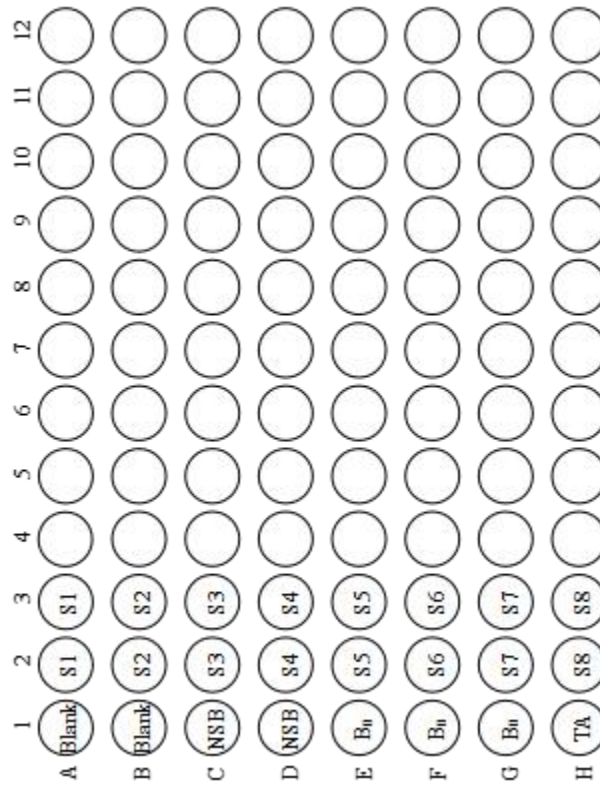
9. 特异性

复合物	交叉反应性
Cortisol	100 %
Deoxycortisol	0.9 %
Prednisolone	5.6 %
Corticosterone	0.6 %
11-Deoxycorticosterone	< 0.1 %
Progesterone	< 0.1 %
17-Hydroxyprogesterone	< 0.1 %
Testosterone/Estradiol/Estriol	< 0.1 %
Danazol	< 0.01 %

10. 检测步骤概要

- 1) 准备所有的试剂和梯度稀释的标准品。板条加入300µl 1×洗液静置浸泡30秒。
- 2) 除了空白、非特异性结合孔 (NSB) 和偶联物总酶活孔 (TA)，其余每孔加入 50 µl 稀释的皮质醇抗体。
- 3) 室温 (25°C±3°C) 孵育 1.5 小时。洗涤 6 次。
- 4) 标准品孔中复孔加入 100 µl 系列稀释的**标准品**。样本孔中加入 100 µl 预处理样本。非特异性结合孔 (NSB) 和最大结合孔 (B₀) 加入 100 µl **标准品稀释液**或**培养基**。(样本稀释请参考第 3 页“样本准备”)。
- 5) 除了空白和偶联物总酶活 (TA) 孔，其余每孔加入 50 µl 稀释的皮质醇偶联物。
- 6) 封膜，室温 (25°C±3°C) 孵育 2 小时。洗涤 6 次。
- 7) 偶联物总酶活 (TA) 孔加入 5 µl 稀释的皮质醇偶联物。
- 8) 每孔加入 100 µl **显色底物**，避光，室温 (25°C±3°C) 孵育 5 - 30 分钟。
- 9) 每孔加入 100 µl **终止液**。
- 10) 30 分钟内，在 450 nm 波长检测 OD 值，参考波长 570 nm 或 630 nm。

11. 排板布局



更多资讯和支持请关注联科生物公众号

