

小鼠皮质醇(Cortisol)ELISA 试剂盒

(用于血清、血浆、组织匀浆、细胞培养上清液和其它生物体内)

原理

本实验采用酶联竞争法及生物素-亲和素放大实验原理。样品中的 Cortisol、生物素标记 Cortisol 与固相板上的抗体 Cortisol 发生竞争结合。反应平衡后,再加入 HRP 酶标记的亲和素,形成 固相抗体-生物素化 Cortisol-亲和素-HRP 复合物。加入底物工作液显色,最后加终止液硫酸,在 450nm 处测 OD 值,随着样品中 Cortisol 浓度的升高,OD 值成逐渐下降的线性关系,可通过 OD 值比对标本中 Cortisol 抗体的浓度。

试剂盒组成 (2-8℃保存)

酶标板 (Coated Wells)	96孔	酶标抗体工作液 (Enzyme Conjugate)	12ml
10×标本稀释液 (Sample Buffer)	12ml	20×浓缩洗涤液 (Wash Buffer)	50ml
标准品 (Standards): 60ng/ml	1瓶	底物工作液 (TMB Solution)	12ml
标记物 (生物素-Cortisol)	6ml	终止液 (Stop Solution)	12ml

准备试剂与收集血样

- 10×标本稀释液用蒸馏水作 1:10 倍稀释 (示例: 1ml 浓稀释液+9ml 蒸馏水)。
- 收集标本: 血清、血浆 (EDTA、柠檬酸盐、肝素抗凝)、细胞培养上清液、组织匀浆等尽早检测, 2-8℃保存 48 小时; 更长时间须冷冻 (-20℃或-70℃) 保存, 避免反复冻融。血清、血浆、尿液 20 倍稀释。唾液不用稀释。
- 标准品液配制: 取 8 个 1.5ml 离心管, 第一管加标本稀释液 400ul, 第二至第八管加入标本稀释液 400ul。在第一管中加入 60ng/ml 的标准品溶液 200ul 置于漩涡混合器上混匀后用加样器吸出 200ul, 移至第二管。如此反复作三倍稀释。
- 洗涤液: 用重蒸水 1:20 稀释 (示例: 1ml 浓缩洗涤液加入 19ml 的重蒸水)

检测程序

- 加样: 依次各加入标准品, 待测样品 50ul。
- 每孔加入生物素-Cortisol 各 50ul。盖紧封板膜以避免交叉污染。将反应板充分混匀后置 37℃60 分钟。
- 洗板: 用洗涤液将反应板充分洗涤 4-6 次, 向滤纸上印干。
- 每孔加酶标抗体工作液 100ul。将反应板置 37℃10 分钟。
- 洗板: 同前。
- 每孔加入底物工作液 100ul, 置 37℃暗处反应 15 分钟。
- 每孔加入 100ul 终止液混匀。
- 30 分钟内用酶标仪在 450nm 处测吸光值。

结果计算与判断

- 以标准品 20、6.67、2.22、0.74、0.24、0.08、0.03、0.01 ng/ml 为横坐标取对数, OD 值为纵坐标, 使用软件作图, 画出标准曲线。
- 根据样品 OD 值计算出相应 Cortisol 含量, 再乘上稀释倍数即可。软件可以向本公司邮件索取。

试剂盒性能

- 灵敏度: 最小的 Cortisol 检测浓度小于 0.004ng/ml。
- 特异性: 可同时检测重组或天然的小鼠 Cortisol。不与小鼠其它细胞因子有交叉反应。
- 重复性: 板内、板间变异系数均小于 10%。

注意事项

- 以上标准孔及待测样品均建议做复孔, 每次测定应同时做标准曲线。
- 洗涤过程很关键。洗涤不充分将导致精确度误差及 OD 值错误地升高。
- 检测时所有试剂都要恢复到室温。板条开封后剩余板条要再封好, 保持板条干燥。
- 试剂盒使用超敏 TMB 溶液, 若显色过深会出现絮状物, 属正常现象, 不影响结果判读。
- 说明书中试剂盒组成为 96T 的量, 48T 的量应减半!
- 本试剂盒宜置 4℃冰箱保存。仅用于科研, 不能用于临床诊断!