

皮质酮酶联免疫吸附测定试剂盒

Corticosterone ELISA Kit

本产品冰袋运输: 保存于 4°C (其中 **酶结合物** 需保存于 -20°C), 保质期 6 个月。

货号规格

HJ222 96次

产品简介

本试剂盒采用竞争法 Elisa 定量检测哺乳动物来源样品中皮质酮 (Corticosterone) 的浓度。高特异性识别皮质酮的抗体已经预包被于酶标板上, 同时加入样品和酶结合物 (辣根过氧化物酶标记的皮质酮), 样品中皮质酮与酶结合物竞争性结合酶标板中包被的抗体。洗去游离的未结合的皮质酮与酶结合物, 加入显色剂 TMB, 与抗体结合的酶结合物上连接的辣根过氧化物酶 (HRP) 就会催化 TMB 氧化生成蓝色物质, 而后加入终止液, 最终产物呈黄色。样品中皮质酮含量越多, 与包被抗体结合的酶结合物就越少, 最终显色就越浅, 即产物颜色与样品中皮质酮的浓度成反比。

背景简介

皮质酮 (Corticosterone, Cort) 是由肾上腺皮质分泌的一种皮质激素, 其作为哺乳动物体内最主要的糖皮质激素, 对海马神经元的伸长、分化及其生理功能也有直接的影响。皮质酮通过与糖皮质激素受体 (Glucocorticoid receptors, GR)、盐皮质激素受体 (Mineralocorticoid receptors, MR) 及尚未完全阐明的膜受体相结合, 从而影响神经元的功能。在应激及衰老等情况下, 血浆皮质酮水平升高, 可导致海马形态与功能损伤, 包括 CA3 区椎体神经元顶树突的萎缩、海马神经元长时程增强 (Long-Term Potentiation, LTP) 的抑制、学习与记忆功能的损伤等。

产品内容

组分	体积或数量
皮质酮抗体预包被板	12条
样品稀释液	16 mL
皮质酮标准品	2支
酶结合物 (HRP标记的皮质酮)	≥2支 (冻干)
浓缩洗涤液 (20×)	30 mL
显色剂 TMB	10 mL
终止液	5 mL
封板胶纸	3张

操作步骤

◆ 样品制备

- 根据样品种类选择相应的处理方法:
 - 细胞上清:** 将细胞培养上清液 100~500×g 离心 5 min, 去除悬浮物后即可;
 - 血清样品:** 将全血在室温下静置 0.5~2 h, 待其自然凝固并析出血清后, 离心取黄色上清即可 (4°C, 1,000~2,000×g, 10 min), 注意请勿吸取沉淀, 制备好的血清需置于冰上待用, 请勿在其中添加任何防腐剂或抗凝剂;
 - 血浆样品:** 使用 EDTA 对全血进行抗凝处理后, 混合均匀置于冰上, 离心取黄色上清即可 (4°C, 1,000~2,000×g, 10 min), 注意请勿吸取沉淀, 制备好的血浆需置于冰上待用;

注意: ① 样品需用 **样品稀释液** 稀释后再进行检测;

- ② 样品在 2~8℃ 下保存请勿超过 24h，如需长期存放(3 个月以上)，应冻存于 -20℃。使用过程中请避免反复冻融；
- ③ 请保证待测样品清澈透明，检测前如发现样品中有悬浮物，需通过离心去除；
- ④ 为了保证检测结果准确，请勿使用溶血、黄疸、高血脂或污染的样品。

◆ 检测准备工作

2. 试剂盒自冰箱取出后，请置于室温平衡 20 min；检测完成后，剩余试剂请及时置于 4℃ 保存；
3. 将 **浓缩洗涤液 (20×)** 用双蒸水或去离子水稀释为 1× 洗涤液，稀释后的洗涤液在 2~8℃ 下可以保存 4 周；
4. 按 **酶结合物** 标签上注明的复溶体积，在其中加入 **样品稀释液**，室温操作，请严格控制在 25~28℃，静置 15~20 min 后轻轻混悬，用移液器吹打数次，使其彻底溶解；
注意：酶结合物 复溶后，不能保存，实验未用完的部分建议丢弃。
5. **皮质酮标准品** 一管为 1 mL，浓度为 1,000 ng/mL，按下表用 **样品稀释液** 倍比梯度稀释后依次加入检测孔中。(最高浓度为 1,000 ng/mL，将 **样品稀释液** 作为浓度 0 ng/mL。)

管号	稀释液用量 (μL)	复溶后标准品用量 (μL)	标准品的最终浓度 (ng/mL)
A	0	250	1,000
B	250	250	500
C	250	250 (从 B 管中取)	250
D	250	250 (从 C 管中取)	125
E	250	250 (从 D 管中取)	62.5
F	250	250 (从 E 管中取)	31.25
G	250	250 (从 F 管中取)	15.625
H	250	0	0

◆ 样品活化与稀释

6. 样品检测前需进行稀释，而血清血浆样品更是需要酸化，将与蛋白结合的皮质醇释放出来，方可进行检测，具体步骤如下：
 - A. 尿液样品：一般可直接进行检测；
 - B. 细胞上清：因含量过低可能无法检测到；
 - C. 血清血浆样品：取 100 μL 样品置于全新的离心管或玻璃管中，加入 100 μL 新配制的 0.6 N 三氯乙酸，混匀后，25~28℃ 孵育 15 min，离心 ($\geq 12,000 \times g$, 4 min) 取上清 100 μL，再加入 100 μL 0.6 N 碱液进行中和，此时样本已被稀释 3 倍。中和后的样品可直接进行检测，注意结果计算时应乘以稀释倍数。如后续检测时样品中皮质醇浓度过高，超过标准曲线最高点，请适度加大稀释倍数后重新检测；

注意：皮质酮标准品无需活化。

◆ 检测流程

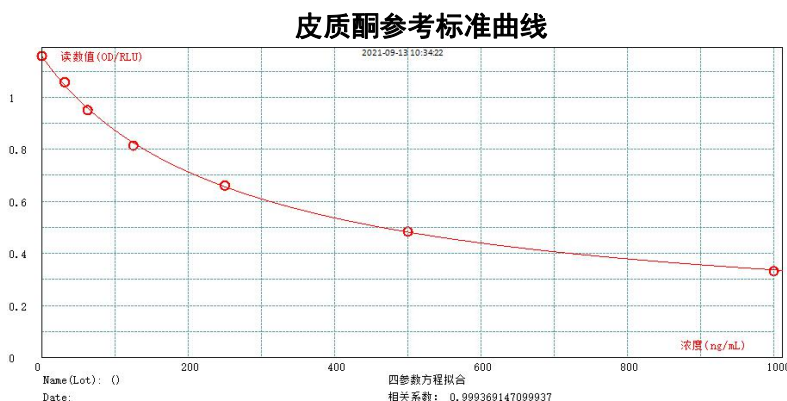
7. 通过计算确定一次实验所需的板条数，取出所需板条放置于框架内，多余的板条请放回铝箔袋密封，保存于 4℃；
**注意：① 标准品和样品建议做双复孔检测；
② 建议设置本底校正孔，即空白孔，只需加入相应体积的 显色剂 TMB 和 终止液 即可；
③ 每次实验均需绘制标准曲线。**
8. 将稀释处理后的样品和不同浓度标准品 (100 μL/孔) 分别加入相应孔中；
注意：整个加样过程不宜超过 10 min，否则可能会影响检测结果。
9. 每孔再加入 50 μL 复溶后的 **酶结合物**，充分混合 10 s，用封板胶纸封住反应孔，室温 (25~28℃) 避光孵育 120 min；
注意：酶结合物 复溶后，不能保存，未用完的部分建议丢弃。
10. 洗板 3 次，每孔 1× 洗涤液用量为 300 μL，注入与吸出间隔 15~30 s，洗完后将板倒扣在厚吸水纸上拍干；
注意：洗涤过程至关重要，洗涤不充分会导致结果产生较大误差。

- 加入 **显色剂 TMB** (100 μL/孔), 室温 (25~28°C) 避光孵育 10~20 min;
注意: 在保存和使用时, 请勿将 TMB 接触氧化剂和金属。
- 加入 **终止液** (50 μL/孔), 混匀后即刻使用酶标仪测量 OD450, 同时设定 540 nm 或 570 nm 作为校正波长, 即可计算得到校正吸光度值 (OD450-OD540 或 OD450-OD570);
注意: 读取 OD 值建议在 10 min 内完成。

◆ 数据分析

- 绘制标准曲线。以标准品浓度作横坐标, OD 值作纵坐标, 利用计算机软件作四参数逻辑 (4-PL) 曲线拟合创建标准曲线, 通过样品的 OD 值即可在标准曲线上计算出其相应浓度。
注意: ① 复孔 OD 值在 20% 的差异范围内结果才有效, 复孔 OD 值取平均后可作为测量值;
② 每个标准品或样品的 OD 值应减去本底校正孔的 OD 值;
③ 若样品 OD 值高于标准曲线上限, 应适当稀释后重测, 计算浓度时应乘以稀释倍数。

◆ 标准曲线范例



注意: 本图仅供参考, 应以同次试验标准品所绘标准曲线计算样品含量。

注意事项

- 浓缩洗涤液** 低温情况下可能会出现结晶, 请水浴加热使结晶完全溶解后再配制工作液;
- 严禁混用不同批号试剂盒的组分;
- 实验操作过程中一定要保证试剂充分混匀, 否则会使结果产生较大误差;
- 加样过程请避免产生气泡;
- 为了您的安全和健康, 请穿实验服并戴一次性手套操作;
- 本产品仅限科研使用。

相关性能参数

- ◆ **重复性:** 板内, 板间变异系数均小于 10%;
- ◆ **灵敏度:** 经重复验证, 本试剂盒小检出量为 13.5 ng/mL。
- ◆ **特异性:** 本试剂盒对各种类似固醇类小分子化合物的交叉反应性见下表:

组分	交叉反应 (%)
皮质酮	100
17-β-雌二醇	<3
雌酮	<5
雌三醇	<6
17-α-乙炔雌二醇	<3
雄烯二酮	<1
17-羟孕酮	<1
醛固酮	<1
睾酮	<1
孕酮	<1

版本号: 21C24