仅供研究，不用于临床诊断。

ELISA试剂盒使用说明书

皮质酮（Corticosterone）ELISA Kit

本试剂盒用于定量检测大鼠和小鼠血清、血浆，唾液及细胞上清中的皮质酮含量。使用前请仔细阅读说明书并检查试剂组分，如有任何疑问请与合肥兰杰柯科技有限公司联系，公司将为您提供强有力的技术支持。

全国统一热线：400-600-4213
www.biosharp.cn

目 录

一、产品简介 …… 2
二、检测原理 …… 2
三、试剂盒组分 …… 3
四、储存条件 …… 3
五、注意事项 …… 3
六、实验过程需自备的仪器与材料 …… 3
七、使用说明 …… 4
7.1 样品处理及保存方法 …… 4
7.2 试剂准备 …… 4
7.3 操作步骤 …… 4
7.4 操作要点提示 …… 5
7.5 结果判断 …… 5
八、常见问题分析及解决 …… 7
九、实际加样情况表 …… 8

皮质酮 (Corticosterone) ELISA KIT

货号	名称	规格
BQEN-585-48T	皮质酮 (Corticosterone) ELISA KIT	48T
BQEN-585-96T	皮质酮 (Corticosterone) ELISA KIT	96T

一、产品简介

皮质酮是由肾上腺皮质分泌的一种糖皮质激素。作为应对于促肾上腺皮质激素（ACTH）刺激肾上腺皮质的反应的产物而产生，皮质酮也是醛固酮的前体。因为压力会增加皮质类固醇激素的产生，所以皮质酮也是压力的主要标志物。饮食限制和烧伤会引起的慢性皮质酮升高。除了压力水平，皮质酮被认为在睡眠-觉醒模式中起决定性作用。

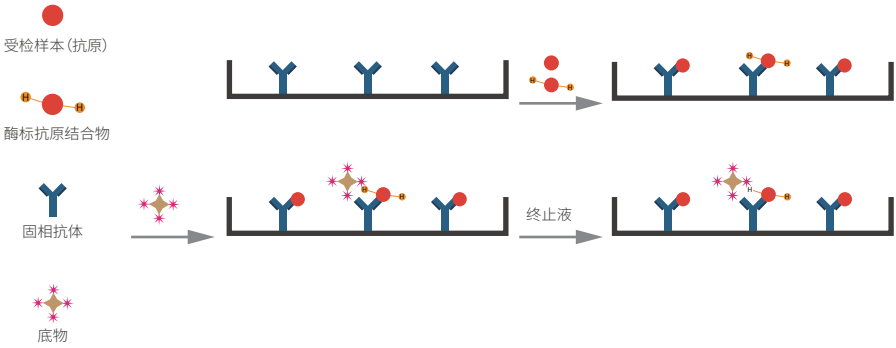
糖皮质激素是由胆固醇通过类固醇生成酶从头合成的。它们主要在肾上腺皮质合成，但也可以通过一些外周组织中的类固醇生成酶从类固醇前体合成。像所有类固醇激素一样，糖皮质激素被释放到血液循环中。而在循环中，大多数糖皮质激素分子（高达95%）被糖皮质激素结合蛋白（CBP）结合，这限制了类固醇的生物利用度。未被CBP结合的糖皮质激素自由地从血流扩散到外周组织并穿过细胞质膜。

血清糖皮质激素浓度遵循昼夜节律模式。它们在24小时内会有3-5倍的变化，并且在醒来前达到最高水平。糖皮质激素也会在情绪或身体应激时释放，并介导急性和慢性应激反应。

皮质酮是啮齿动物、鸟类、两栖动物和爬行动物的主要糖皮质激素，在绵羊、猪和狗中也大量存在。在人类中，皮质酮具有较弱的糖皮质激素活性，相反，它是导致醛固酮合成的类固醇生成途径的中间产物。糖皮质激素在几乎所有的细胞类型中调节不同的生物过程，是生理应激反应的关键介质。

二、检测原理

本实验采用竞争法检测原理。用高特异性识别皮质酮的抗体预包被酶标板，加入适度稀释的样本和HRP连接的皮质酮结合物，样本中皮质酮与皮质酮结合物竞争性结合酶标板中包被的抗体，洗去游离成分；加入TMB底物，与抗体结合的皮质酮结合物上带的HRP就会催化底物TMB反应，颜色显蓝色，中止后显黄色。如果样本中皮质酮含量越多，则与包被的抗体结合的皮质酮结合物则越少，颜色则越浅，即颜色与样本中的浓度成反比。



三、试剂盒组成

组分编号	组分	96T	48T	储存条件
BQEN-585-1	**皮质酮HRP酶结合物**	**≥2支(冻干)**	**≥1支(冻干)**	**-20℃**
BQEN-585-2	样本稀释液	16mL	8mL	2-8℃
BQEN-585-3	皮质酮标准品	2支	1支	2-8℃
BQEN-585-4	浓缩洗涤液 20×	30mL	15mL	2-8℃
BQEN-585-5	TMB底物	10mL	5mL	2-8℃
BQEN-585-6	终止液	5mL	5mL	2-8℃
BQEN-585-7	皮质酮抗体预包被板	12条	6条	2-8℃
BQEN-585-8	封板胶纸	3张	2张	2-8℃
BQEN-585-9	三氯乙酸0.6N	1瓶	1瓶	RT
BQEN-585-10	氢氧化钠	1瓶	1瓶	RT
	说明书	1份	1份	

四、储存条件

产品收到后如果不立即使用,请根据提示将不同的组分放到对应的储存条件储存(冻干HRP酶结合物-20℃保存,其它组分2-8℃保存)。试剂盒有效期6个月，酶标板拆开后建议一个月内使用完毕。

五、注意事项

1、未开封的试剂应保存在2－8℃。除辣根过氧化物酶标记皮质酮冻干粉-20℃保存。包装箔袋开封后，应立即封紧。开封后的包被微孔板储存在2－8℃下可以稳定6个星期。

2、由于辣根过氧化物酶标记皮质酮是冻干粉，在制备后需要严格校准，所以瓶数应以实际收到的试剂盒为准。

3、所有试剂和所需的微孔板条在使用前应平衡至室温。

4、辣根过氧化物酶标记皮质酮冻干粉复溶加样后，为了确保其使用的准确性，如有剩余请丢弃避免再次使用。

5、TMB溶液请勿接触氧化剂和金属，避免失效。

6、不同批号试剂不可混用。

7、为避免交叉污染请使用一次性吸头。

8、洗涤过程是至关重要的，洗涤不充分会使精确度下降并导致结果误差较大，请严格按照说明书的洗涤次数和浸泡时间进行洗涤(机器洗板按设定的程序洗板,人工洗板浸泡时间可适当延长)。

9、在试验中标准品和样本检测时建议作双复孔或三复孔，加入试剂的顺序应一致，以保证所有反应孔孵育的时间一样。

10、加样过程中避免气泡的产生。

11、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。

12、为了您的安全和健康，请穿实验服并戴一次性手套操作。

六、实验过程需自备的仪器与材料

1、酶标仪(450nm)

2、高精度可调移液器及吸头：0.5-10，2-20，20-200，200-1000μL;一次检测样品较多时，最好用多通道移液器

3、自动洗板机或洗瓶

4、双蒸水或去离子水

5、可控温水浴箱(37℃)。

七、使用说明

7.1 样品处理及保存方法

1.血清：血清样本应是自然凝固后，取上清，样本收集时，请注意不同样本凝血时间尽可能保持一致。

2.血浆：血浆样本收集时，如果不能及时离心，需添加抗凝剂，建议尽量用EDTA抗凝剂。

3.尿液样本直接检测，细胞上清样本估计量太少检测不出。血清血浆样本需酸化将与蛋白结合的皮质醇释放出来再检测，具体方法如下：

100μL of serum or plasma 加入100μL新配0.6N的三氯乙酸，混匀后，25~28度孵育15分钟，离心力大于12000g的速度，离心4分钟，取上清100μL，再加入100μL的碱液中和成中性液体，此时样本已被稀释3倍，后面样本含量计算时需乘以此处的稀释倍数3。上面中和后的样本就可以直接检测了。

4.保存：样品在2－8℃下保存不超过24小时。如果样品需要长期存放（3个月以上），应冻存在－20℃。使用过程中应避免反复冻融。

5.避免使用明显溶血、黄疸、脂血样本，否则结果将不准确。

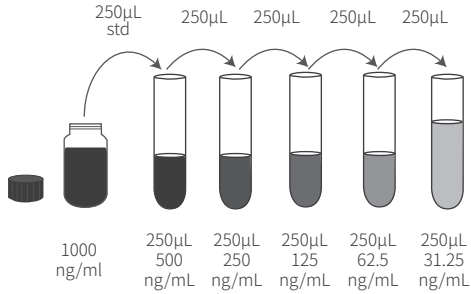
7.2 试剂准备

1. 提前30min从冰箱中取出试剂盒，平衡至室温（25～28℃）。

2.洗涤缓冲液：将浓缩洗涤液用蒸馏水稀释成1x洗涤工作液（一份加19份水），稀释后的洗涤液在2－8℃下可以保存4个星期。未用完的放回4℃。

3. 如有5x标准品稀释液，请按所需量用双蒸水或去离子水稀释(1份加4水)。

4. 标准品：使用时直接取用皮质酮标准品1mL（无需稀释），浓度为1000ng/mL,作为最高浓度，用样本稀释液按倍比梯度稀释后依次加入检测孔中，0浓度标准品以样本稀释液直接加入，见下图(建议标准曲线使用以下浓度：1000、500、250、125、62.5、31.25、0 ng/mL)。稀释的标准品不得重复使用。



标准品稀释方法

7.3 操作步骤

1. 按照上述准备工作配制好各种溶液。

2.根据待测样品数量和标准品的数量决定所需的板条数，并增加1孔作为空白对照孔，设置方法为该孔只加TMB显色液和中止液。

3.分别移取梯度稀释后100ul标准品以及样本至相应微孔中，整个加样时间间隔时间不宜超过10分钟，否则可能会影响检测结果。

4.按照标签信息，向每支皮质酮HRP酶结合物中加入对应体积的样品稀释液复溶10-15分钟至皮质酮HRP酶结合物工作浓度。每孔加入50μL复溶后的工作浓度酶结合物，用封板胶纸封住反应孔，充分混合10秒钟。25-28°C避光孵育120分钟。酶结合物复溶后，不能保存，未用完的剩余部分建议丢弃。

5.洗板3次：(1)自动洗板机：要求注入的洗涤液为每孔300μL，注入与吸出间隔15-30秒。(2)手工洗板：甩尽孔内液体，每孔加洗涤液300μL，静置30秒后甩尽液体。最后一次洗板完成后将板倒扣在厚吸水纸上拍干。

注：请严格按照洗板次数洗板，洗涤操作的正确与否将影响整个实验分析的灵敏度和精密度。

6.加入显色剂底物TMB 100μL/孔，避光，室温（25-28℃）孵育20分钟。

7.加入终止液50μL/孔，终止酶反应。混匀后即刻测量OD_{450}值(参考波长600-650nm)。读取OD值最好在10分钟内完成。

7.4 操作要点提示

1. 配制各种试剂时要充分混匀，但要避免产生大量泡沫，以免加样时加入大量的气泡，产生加样误差。

2. 为避免交叉污染，在加入不同浓度的标准品、不同样品、不同试剂时谨记及时更换吸头。

3. 为了确保准确的结果，在每次孵育前均需使用新封板胶纸封住反应孔。

4.显色剂在添加之前，应保持无色，请勿使用已变为蓝色的显色溶液。最佳显色时间对标准曲线很重要，肉眼可见前3-4孔有梯度蓝色，后3-4孔差别不明显，零孔无蓝色出现即可终止。

5.任何样品浓度如果高于最高标准品浓度，样品应用零浓度标准品作适当稀释后重新测量分析。每次检测均要做标准曲线，根据样品待测因子的含量，适当稀释或浓缩样本，最好做预实验。

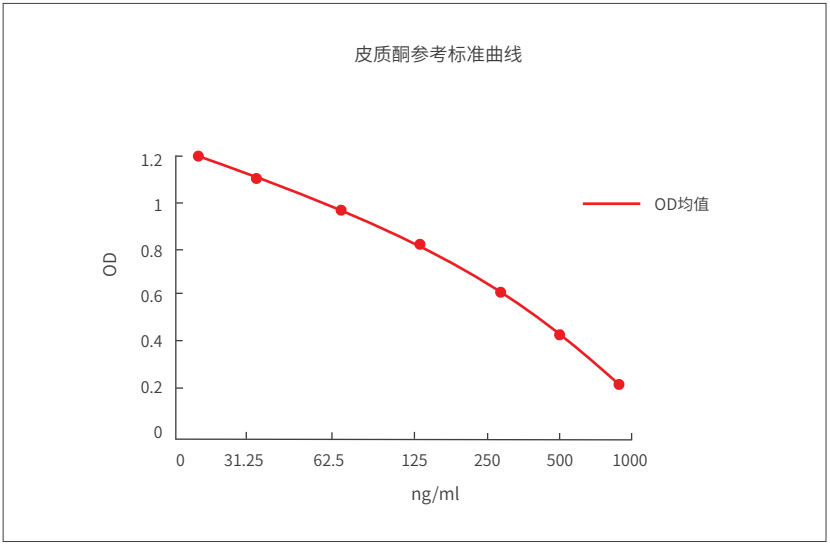
7.5 结果判断

1. 每个标准品和标本的OD值应减去空白孔的OD值，如果做复孔，值在20%的差异范围内结果才有效，求其平均值。

2.可根据使用习惯及实验室建立的模型，使用计算机软件计算相应的样本浓度。也可用EXCEL软件，标准曲线的将OD值放Y轴，浓度放X轴，拟合曲线，计算样本结果。

3.若标本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算标本含量。

4.参考数据：



注：本图仅供参考，应以同次试验标准品所绘标准曲线为准。

重复性

板内，板间变异系数均<10%。

灵敏度

经重复验证，本试剂盒最低可检测的皮质醇浓度为13.5ng/ml。最低检出量测定方法：20个零标准的平均OD值增加两个标准差，再计算相应的浓度。

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

八、常见问题分析及解决

问题	可能原因	解决办法
无颜色	不同试剂盒或不同批号的试剂混合	重新检查试剂的标签，确准所有组分都属于正使用的试剂盒中的。不能混用不同试剂盒或不同批号的试剂。
	漏加酶	检查操作流程，注意不要漏加
	HRP酶污染了叠氮钠	使用新配制的试剂，禁含叠氮钠
	试剂配制/使用有误	重做试验，严格按说明书操作，每次配制和使用前看清标签
显色弱	超过有效期的产品可能会产生很弱的信号	检查产品有效期
	缩短孵育时间能使实验信号变弱	检查孵育时间
	使用了被污染的试剂	检查试剂是否被污染
	仪器设定不正确，滤光片不匹配	仪器是否设定正确，滤光片的使用等
	洗涤操作不规范	洗涤不充分，使用手工洗板常出现
		洗瓶洗涤，每孔应完全充满洗涤缓冲液，倾出时应迅速
		若用洗板机，应校准并设定足够充满每孔的体积量。板内侧不应接触设备
		检查每孔是否有残留的洗液或每孔加样量的体积是否准确
		可在两次洗板之间加30秒的浸泡
高背景	实验中孵育温度和时间不适当	确定每一试验步骤的孵育温度和时间是否适当
	酶加量过多	加酶前验看移液器调节量是否准确
		检查稀释度，若必要进行效价测定
全部板子变成规则的蓝色	不充分的洗涤/洗涤步骤被遗漏使没结合的HRP仍有残留	最好使用洗板机充分洗涤
		检查每孔是否有残留的洗液或加样量是否准确
	太多的酶结合物	检查稀释度，必要时进行效价测定
	封板膜或试剂容器被重复使用，导致HRP残留，使TMB底物产生非特异蓝色	使用新封板膜，每步使用不同的试剂容器
高CV值花板	操作不慎或洗涤不充分	按说明书洗板、加样和显色，洗板尤为重要
	出现干板，没有使用封板膜、封板膜重复使用	确定每两步骤间酶标板应保持湿润
		使用封板膜封口，注意每步使用新鲜的封板膜
	移液器不准确，吸头重复使用	检查并校准移液器，每次取样必须更换吸头
标准曲线可得到，但两点之间区别很差（低或平的曲线）	酶结合物不足	检查稀释度，必要时进行效价测定
	检测抗体不足	检查稀释度，必要进行效价测定
	板子显色不足	延长底物孵育时间
		使用推荐品牌的底物溶液
标准曲线很好，但没有任何期望的阳性信号	标本中无相应的待检测物质	使用内参对照
		重复实验，重新考虑实验的相应参数
	标本基质遮盖检测	将标本至少做1:2相应的稀释，或进行系列稀释
标准曲线很好，但标本的判读值很高	标本中含的待检物质水平超过实验范围	稀释标本
边缘效应	工作环境温度不均衡	避免将板子在变化温度环境中孵育
漂移	实验过程中出现间断	整个实验应连续操作，在实验开始前将所有的标准品和标本做适当的准备。
	试剂没有按说明书平衡至室温	在所有试剂加入孔前，确保它们已平衡至室温，除非说明书中有另外的要求。
	是否可更改试剂盒所提供的操作步骤？	一般厂商为确保最高的灵敏度，对试剂盒都进行了优化，为确保每一试剂盒实验的规范性应按说明书操作。
	是否可混用不同批次试剂盒中的试剂？	不可以，绝大多数试剂在每批试剂盒中是特异的，若有问题可与厂家或代理商联系。
	是否可增加或减少标本的体积？	商品化的试剂盒所需加入的标本体积是优化的，应按说明书操作，不建议更改所加标本体积。
	是否可重新确定自己的标准曲线的点？	可以。说明书上有建议制备标准曲线时标准品的稀释度，可改变稀释倍数和增加曲线的点，但是必须在实验范围内，高于试剂盒中最高标准品的点和低于灵敏度以下的点是无效的。

实际加样情况表

1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12