

## Cortisol（皮质醇）EIA 检测试剂盒

### 在 Modulus™ 微孔板型多功能检测仪上的应用



#### 1. 应用说明

Cortisol（皮质醇，又名氢化可的松）是人肾上腺分泌的最强的皮质激素。与其他肾上腺激素一样，Cortisol 是由胆固醇在肾上腺皮质中经过一系列酶促反应形成的。由胆固醇转化为孕烯醇酮是这个反应的第一步，也是反应的限速步骤。

第一步反应由脑垂体促肾上腺皮质激素（ACTH）调控，而 ACTH 又受下丘脑促肾上腺皮质激素释放因子（CRF）调控。高浓度的 Cortisol 会抑制 ACTH 和 CRF 的分泌。在血液中，多数 Cortisol 高度紧密的结合在 CBG（皮质类固醇结合球蛋白），其余的 Cortisol 主要与清蛋白松散结合。Cortisol 通过糖异生途径，在抗炎反应以及稳定血压等方面起作用。Cortisol 还通过细胞内受体影响许多生理系统，如免疫反应、血糖调节、血管紧张度调节、酶促反应、骨骼新陈代谢等。

Turner BioSystems 公司的 Modulus™ 微孔板型多功能检测仪与 Monobind 的 Cortisol EIA 检测试剂盒联用，可以准确方便的在 96 孔板中检测 cortisol 浓度，其检测下限可达 0.25ug/dL。

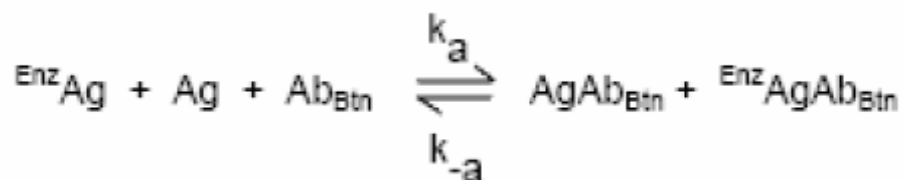
#### 2. 实验准备

- [Modulus™ 微孔板型多功能检测仪](#)
- 吸收光检测模块
- Cortisol EIA Assay Kit (Monobind, Inc., 3625-300), including:
  - **Human Serum references, 1 mL/vial.** Six vials of serum reference for Cortisol at concentrations of 0 (A), 1.0 (B), 4.0 (C), 10.0 (D), 20.0 (E), and 50.0 (F) µg/dL. A preservative has been added. Store at 2 - 8° C.
  - **Cortisol Enzyme Reagent, 1 mL/vial.** One vial of Cortisol (Analog)- horseradish peroxides (HRP) conjugate in a protein-stabilizing matrix with blue dye. Store at 2 - 8° C.
  - **Cortisol Conjugate Buffer, 7 mL/vial.** One vial of reagent containing buffer, red dye, preservative, and binding protein inhibitors. Store at 2 - 8° C.
  - **Cortisol Biotin Reagent, 7 mL bottle.** One bottle of reagent containing anticortisol biotinylated mIgG conjugate in buffer, green dye, and preservative. Store at 2 - 8° C.
  - **Streptavidin-Coated Plate, 96-well plate.** One 96-well microplate coated with 1.0 µg/mL streptavidin and packaged in an aluminum bag with drying agent. Store at 2 - 8° C.
  - **Wash Solution, 20 mL vial.** One vial containing a surfactant in buffered saline. A preservative has been added. Store at 2 - 8° C.
  - **Substrate A, 7 mL/vial.** One vial containing tetramethylbenzidine (TMB) in buffer. Store at 2 - 8° C.
  - **Substrate B, 7 mL/vial.** One vial containing hydrogen peroxide (H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>) in buffer. Store at 2 - 8° C.
  - **Stop Solution, 8 mL/vial.** One vial containing a strong acid (1N HCL). Store at 2 - 30° C.

## 实验原理

### 竞争性酶免分析:

酶免疫分析所必须的试剂有: 抗体、酶-抗原复合物、抗原。将生物素化的抗体与酶-抗原复合物以及包含有天然抗原的血清混合, 天然抗原与酶-抗原复合物将会竞争性的结合抗体:



AbC.W.= 特异性抗体 (数量固定)

Ag = 天然抗原 (数量可变)

EnzAg = 酶-抗原复合物 (数量固定)

AgAbBtn = 抗原-抗体复合物

EnzAgAbBtn = 酶-抗原-抗体复合物

ka = 结合常数

k-a = 解离常数

K = ka/k-a = 平衡常数

同时抗体上的生物素与微孔板上的亲和素结合, 这样清洗板孔时, 抗体不至于被去除。

$\text{AgAb}_{\text{Btn}} + \text{EnzAgAb}_{\text{Btn}} + \text{Streptavidin}_{\text{CW}} \longrightarrow \text{Immobilized Complex}$

Streptavidin<sub>CW</sub> = Streptavidin immobilized on well

Immobilized complex = sandwich complex bound to the solid surface

在复合物中, 酶反应将于天然抗原浓度成反比。通过一系列已知浓度的抗原就可以检测未知样品的抗原浓度。使用检测的数据制作相应的曲线。

## 3. 实验方法

### 3.1 样品收集与准备

- 样品必须为血液, 无论是血清还是血浆, 而且要遵守静脉穿刺采样的规则。为了检测更准确, 需要早晨空腹采血。血样应该收集在不含抗凝血剂或添加剂的静脉穿刺瓶或含有EDTA或肝素的空瓶中。血样可以有凝块。离心样品, 将血细胞与血清或血浆分离。
- 样品存放于2 - 8°C, 最多不超过5天。如果短时间内不能检测, 样品需要储存于-20°C, 这样最多可以存30天。低温存储的样品要避免反复冻融。检测时一式两份, 需要50ul样品。

### 3.2 试剂准备

- 酶工作液: 将 0.7ml 的 Cortisol 酶溶液加入到一份 Cortisol 酶缓冲液中, 存储于 2 - 8°C
- 冲洗缓冲液: 使用蒸馏水或去离子水将冲洗溶液稀释到 1000ml。室温下(20 - 27°C)存储不超过 60 天
- 底物工作液: 将“溶液 A”倒入“溶液 B”混合, 存储于 2 - 8°C。

### 3.3 检测步骤

在检测前，将所有血样与检测试剂平衡到室温(20 - 27℃)

- a) 在微孔板中分配参考血样、阳性样品、病人样品等，双复孔设计
- b) 在孔中加入 25  $\mu\text{L}$  的参考血样、阳性样品、病人样品
- c) 每孔加入 50  $\mu\text{L}$  Cortisol 酶工作液
- d) 轻轻震荡微孔板 20-30s 以混匀溶液
- e) 每孔加入 50  $\mu\text{L}$  Cortisol 生物素试剂
- f) 轻轻震荡微孔板 20-30s 以混匀溶液
- g) 盖住微孔板，在室温下孵育 60min
- h) 吸出或倒掉微孔板中的溶液，使用吸水纸吸干
- i) 每孔加入 300  $\mu\text{L}$  的清洗缓冲液，然后再倒掉，重复两次
- j) 每孔加入 100  $\mu\text{L}$  底物工作液

注意：为了减少误差，每次都按照相同的顺序加液体。

注意：加入底物工作液后，不要震荡或摇晃微孔板

- k) 室温下孵育 15min
- l) 每孔加入 50 $\mu\text{L}$  终止反应液，轻轻混合 15-20s
- m) 使用 Modulus™ 微孔板型多功能检测仪在 450nm 处检测每孔的吸光度，使用 650nm 作为参比波长，用来减少空间差异。

注意：要在加入终止反应液 30min 内检测结果

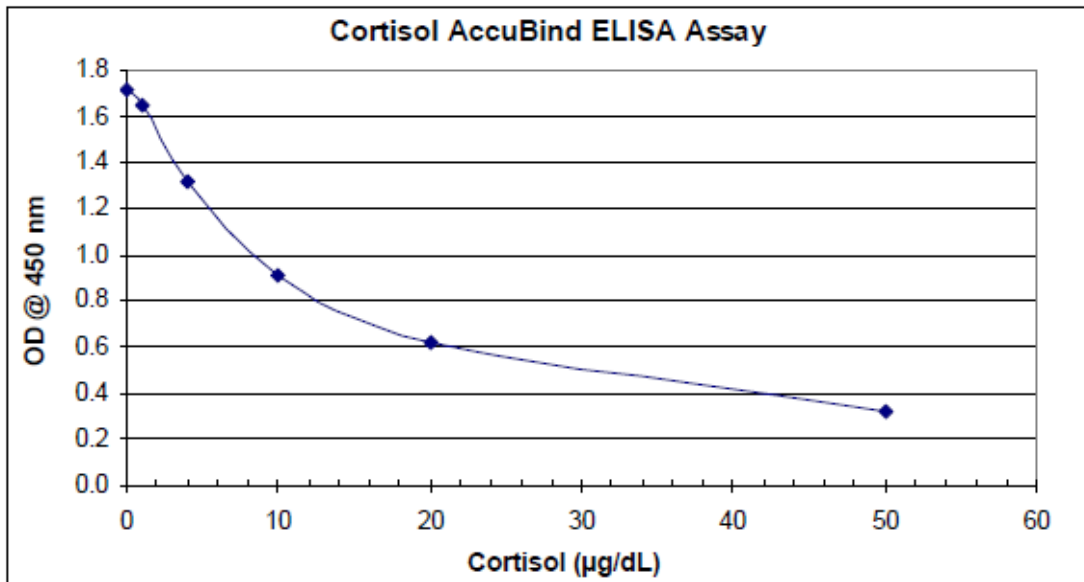


图 1.使用 Modulus™ 微孔板型多功能检测仪检测 cortisol 的反应曲线

### 4 结果

- a) 灵敏度：<250 $\mu\text{g/dL}$  cortisol
- b) 仪器检测线性范围：0-4.0OD @ 450 - 700nm

## 5 关于 Modulus™ 微孔板型多功能检测仪

Modulus™ 微孔板多功能检测仪是 Turner Biosystems 公司生产的一款集生物发光与化学发光检测、荧光检测、可见光吸光度检测于一体的多功能检测仪器。Modulus™ 微孔板多功能检测仪具有发光检测模块、荧光检测模块、吸收光检测模块、自动进样系统，且可以自由组合，或后期自行升级安装。用户可根据实验需求选择合适的功能模块，来完成生物与化学发光、荧光和可见光吸光度检测。

## 6. REFERENCES

1. Burtis, C.A., Ashweed, E.R. Tietz Textbook of Clinical Chemistry. Philadelphia: W.B. Saunders Company, 2nd edition, 1994: 1825 - 1827.
2. Foster, L., Dunn, R. "Single antibody technique for radioimmunoassay of cortisol in unextracted serum or plasma." Clin. Chem.20 (1974): 365.
3. Williams Textbook of Endocrinology. Edited by Wilson, J.D., Foster, D.W. Philadelphia: WB Saunders, 7th edition, 1985.
4. Monobind Data Sheet 3625-300: Monobind Cortisol EIA Kit.