本公司提供的电子版本说明书仅供参考，实验请以收到的纸质手册为准。

TK01204 /96空板

Enzyme immunoassay (ELISA) technique.

For Cortisol (Free in Saliva)

物种: Human

第三版

[产品简介]

本试剂盒采用夹心法原理。将特异性抗Human Cortisol (Free in Saliva) 抗体包被于 96 孔微孔板中，向微孔中分别加入Human Cortisol (Free in Saliva) 标 准品和标本，使标准品中的Human Cortisol (Free in Saliva) 蛋白及标本中的Human Cortisol (Free in Saliva) 蛋白与固相于微孔板上的抗Human Cortisol (Free in Saliva) 抗体结合，然后加入辣根过氧化物酶标记抗Human Cortisol (Free in Saliva) 抗体，将未结合的辣根过氧化物酶标记抗Human Cortisol (Free in Saliva) 抗体洗净后， 加入 TMB 底物显色。TMB在过氧化物酶的催化下转化成蓝色，并在酸的作用下转化成最终的黄色。颜色的深浅和样品中的Human Cortisol (Free in Saliva) 蛋白呈正相关。用酶标仪在 450nm 波长下测定吸光度(O.D.值)，计算样品浓度。

[试剂盒组分]

组分	数量	组分	数量
Pre-coated, ready to use 96-well strip plate	1	Plate sealer for 96 wells	4
Standard	2	Standard Diluent	1×20mL
Detection Reagent A	1×120 μ L	Assay Diluent A	1×12mL
Detection Reagent B	1×120 μ L	Assay Diluent B	1×12mL
TMB Substrate	1×9mL	Stop Solution	1×6mL
Wash Buffer (30 × concentrate)	1×20mL	说明书	1

[需要准备的相关试剂及设备]

1. 可检测 450nm 吸光度的酶标仪.
2. 单道及多道移液器.
3. 恒温箱.
4. D洗板机（可选）.
5. 混匀器.
6. 灭菌的 EP 管.
7. 蒸馏水或去离子水.
8. 配置洗液或相关工作液用的灭菌玻璃容器.

[样本收集准备及保存]

本试剂盒可检测人血清、血浆、尿液及相关体液。具体标本处理方法如下：

1. 血清：将收集于血清分离管的全血标本在室温放置 2 小时或 4°C过夜，然后 1000×g 离心 20 分钟，取上清即可，或将上清置于-20°C或-80°C保存，但应避免反复冻融。

2. 血浆：用枸橼酸盐或肝素作为抗凝剂采集标本，并将标本在采集后的 30 分钟内于 2-8°C 1000×g 离心 15 分钟，取上清即可检测，或将上清置于-20°C或-80°C保存，但应避免反复冻融。
3. 尿液：用无菌管收集 1000×g 离心 20 分钟，取上清即可检测。
4. 其它生物标本：请 1000×g 离心 20 分钟，取上清即可检测，或将上清置于-20°C或-80°C保存，但应避免反复冻融。

注意：

1. 以上标本均需密封保存，4°C保存应小于 1 周，-20°C保存小于 6 个月。
2. 标本溶血会影响最后检测结果，因此溶血标本不宜进行此项检测。
3. 标本使用前应缓慢平衡至室温，不应加热使之溶解。

[相关试剂准备]

部分试剂需您配置成工作液后再使用。

1. 所有试剂在启用前请于室温平衡 30 分钟，室温请控制在 25°C左右。酶标板平衡请不要拆掉封口袋。
2. Cortisol (Free in Saliva) Standard：Cortisol (Free in Saliva) 标准品为冻干粉。每支标准品加入 Cortisol (Free in Saliva) 标准品稀释液 1.0mL， 即为 10ng/mL。盖好后室温静置 3 分钟，使用混匀器混匀或颠倒混匀。此后进行倍比稀释成 10ng/mL，5ng/mL，2.5ng/mL，1.25ng/mL，0.625ng/mL，0.312ng/mL，0.156ng/mL，标准品稀释液(0ng/mL)为空白孔。根据您需要的量配置好标准品待用。配置好的标准品建议在 15 分钟内加样，不建议放置过长时间。
3. Cortisol (Free in Saliva) Conjugate：Cortisol (Free in Saliva) 标记抗体为 100x 高浓度试剂。使用前用 Cortisol (Free in Saliva) 标记抗体稀释液 将其稀释 100 倍。根据需要的量配置好工作液待用。配置好的工作液建议在 15 分钟内加样，不建议放置过长 时间。
4. SA-HRP：链亲和素-HRP 为 100x 高浓度试剂。使用前用链亲和素-HRP 稀释液将其稀释 100 倍。根据您需要的量 配置好工作液待用。配置好的工作液建议在 15 分钟内加样，不建议放置过长时间。
5. Wash Buffer：洗液为 30x 高浓度试剂。使用前用蒸馏水或去离子水将其稀释 30 倍。

注意：

1. 为了保证实验时间的准确性，建议您提前 10 分钟配置好您要使用的试剂。
2. 溶解使用过的标准品溶液不建议过夜使用，部分蛋白的活性可能因此损失。
3. 配置好的工作液不建议过夜使用，标记抗体及酶活性可能因此损失。
4. 高浓度的试剂使用前可进行离心，再根据您的实验要求吸取一定量配置成工作液。
5. 实验中请使用本试剂盒提供的洗液，请勿使用其他厂家的洗液，否则可能造成实验结果不理想。
6. TMB Substrate 使用中避免污染；避免接触金属制品，以免引起试剂失效。
7. Stop Solution 溶液有弱腐蚀性，避免飞溅引起损伤。
8. 需要稀释配置成工作液的试剂，请在配置好后注意充分混匀，否则可能造成实验结果不理想。
9. 需要稀释配置成工作液的试剂，请使用无菌容器进行配置，否则可能造成实验结果不理想。
10. 实验过程中建议佩戴口罩，以免由于唾液飞溅对检测结果造成干扰（唾液中含有大量酶等物质）。

[样本预处理]

1. 血清：建议样本原液-10 倍稀释后检测。
2. 血浆：建议样本原液-10 倍稀释后检测。

3. 尿液：建议样本原液检测。
4. 其它生物标本：请根据您的标本的预计含量选择合适的稀释倍数。

注意：

1. 如您要测试的样本数量较多可使用 0.01M PBS 代替本试剂盒中的标准品稀释液对标本进行稀释。
2. 由于生物机体处于不同状态下蛋白的表达量不一，以上建议的样本稀释液倍数为正常分布状态。建议可在正式实验前做预实验确定稀释倍数，以免损失您的样本。
3. 样本使用前均应进行离心处理，以保证检测结果的重复性。
4. 由于不同蛋白在不同保存情况下的稳定性均不相同，您在开始实验前应注意样本的保存形式、缓冲液体系、以及保存的温度。

[实验步骤]

1. **试剂平衡：**将需要使用的相关试剂，如：预包被微孔板、标准品、标准品稀释液、待检测的样本，在实验开始前于室温平衡 30 分钟。
2. **取出酶标板：**根据实验需要，取出相应的预包被条。剩余部分，放回封袋中于-20°C保存。
3. **加样：**标准品加样，依次加入 100ul 不同浓度的标准品。空白孔加 100ul 标准品稀释液，余孔加待测样品 100ul 每孔，酶标板加上覆膜，37°C温育 2 小时。推荐测试 2 条平行的标准曲线，计算时取平均值。
4. **加标记抗体工作液：**弃去液体，甩干，不用洗涤。每孔加标记抗体工作液(可提前 15 分钟配制)100ul 每孔，酶标板加上覆膜，37°C温育 1 小时。
5. **洗板，弃去孔内液体：**洗板 3 次。每孔用 350ul 的洗涤液洗涤，浸泡 1-2 分钟，甩掉酶标板内的液体(或用洗板机进行洗板）。最后一次洗涤完成后，在吸水纸上将酶标板拍干。
6. **加链亲和素-HRP 工作液：**酶标板拍干后，立即每孔加链亲和素-HRP 工作液(可提前 15 分钟配制)100ul 每孔，加上覆膜，37°C温育 30 分钟。
7. **洗板,加 TMB 底物溶液：**弃去孔内液体，甩干，洗板 5 次，方法同步骤 5。立即每孔加 TMB 底物溶液 90ul，酶标板加上覆膜，37°C避光显色(反应时间控制在 15-25 分钟，不要超过 30 分钟。当显色反应有明显的梯度蓝色， 即加入终止液终止反应)。
8. **加终止液,读数：**每孔加终止液 50ul，终止反应，此时蓝色立转黄色。轻轻晃动酶标板使终止反应充分进行。轻拭酶标板底部，立即使用酶标仪在 450nm 波长测量各孔的光密度(OD 值)。推荐使用双波长进行检测：450nm， 630nm。

[结果计算]

将标准品、空白孔、样本 OD 值取其平均值计算。以标准品的浓度为纵坐标(或对数坐标)，OD 值为横坐标(或对数坐标），绘出标准曲线。推荐使用曲线专家软件进行分析。根据标准物的浓度与 OD 值计算出标准曲线的回归方程式，将样品的 OD 值代入方程式，计算出样品浓度，再乘以稀释倍数，即为样品的实际浓度。

[检测范围]

0 / 2 - 80 ng/mL.

[灵敏度]

用标准品稀释液做为样本进行检测，重复测定 20 次，得出 20 次测量结果的吸光度值，计算其平均值（M）和标

准差（SD），得出 M+2SD 对应的值为本试剂盒的检测灵敏度。经测试本试剂盒的灵敏度为0.54 ng/mL.

[特异性]

本试剂盒用于特异性检测人天然或重组Cortisol (Free in Saliva)，经检测与其它相似物质无明显交叉反应。

[精密度]

用同一份质控样品，在一个批次的产品内重复检测 10 次，计算变异系数（CV）。测试 CV< 10%
用 3 个批次的产品检测同一份样本，计算 3 个批次的产品之间的变异系数（CV）。测试 CV< 12%。
批内差: CV<10%
批间差: CV<12%

[重复性]

用高中低 3 个浓度的质控样品，在一个批次的产品内分别重复检测 10 次，计算变异系数（CV）。测试 CV< 11%。

[稳定性]

根据相关行业标准，对试剂盒进行热稳定性测试。在 37°C，破坏 3 天后，对试剂盒的检测灵敏度、特异性、重复性进行复检，计算各项参数均符合要求。

[有效期]

本试剂盒有效期为六个月。

[相关注意事项]

1. 本产品中 Stop Solution 为稀硫酸，有轻微的腐蚀性，请注意做好相应的防护。
2. 请使用本产品时注意试剂不要混用其他批次或者其他厂家的，否则结果可能与预期存在差异。
3. 收到产品后，请务必按照说明书的要求存放试剂。
4. .请在实验开始前，确定已准备好需要的实验用具及相关仪器，以免给实验造成不必要的困扰。
5. 本产品在生产后均进行了相关的检测，如对实验结果有疑问，请联系我们。