



PRODUCT MANUAL

Cortisol ELISA kit

Catalogue # : ADI-900-071

Kit de 96-puits



PRODUCT MANUAL

UTILISATION A OBJECTIF DE RECHERCHE UNIQUEMENT

Ce produit est fabriqué et vendu par Enzo Life Sciences, Inc uniquement pour la recherche et n'est pas destiné à des fins diagnostiques ou une utilisation thérapeutique. L'achat n'inclut pas un droit ou une licence d'utilisation, de développer ou exploiter ce produit commercialement. Toute utilisation commerciale, développement ou exploitation de ce produit sans autorisation écrite préalable de la part d'Enzo Life Sciences, Inc. est strictement interdite.

GARANTIE LIMITÉE

Ces produits sont proposés sous une garantie limitée. Les produits sont garantis à répondre aux spécifications correspondantes décrites dans la notice au moment de l'expédition. La seule obligation d'Enzo Life Sciences est de remplacer les produits à la mesure du prix d'achat. Toutes réclamations doivent être faites à Enzo Life Sciences, Inc. dans les cinq jours suivant la réception de la commande.

MARQUES ET BREVETS

Plusieurs des produits d'Enzo et les applications de ces produits sont couverts par des brevets aux États-Unis et à l'étranger et des brevets en instance. Enzo est une marque d'Enzo Life Sciences, Inc.

SOMMAIRE

Description.....	4
Introduction.....	5
Précautions.....	6
Matériels fournis.....	7
Stockage.....	8
Autres matériels nécessaires.....	8
Manipulation des échantillons.....	9
Remarques pour la procédure.....	11
Préparation des réactifs.....	12
Protocole.....	13
Calcul des résultats.....	14
Exemple de résultats.....	15
Exemple de courbe standard.....	16
Spécifications.....	17
Rendement pour différents échantillons.....	20
Références.....	21

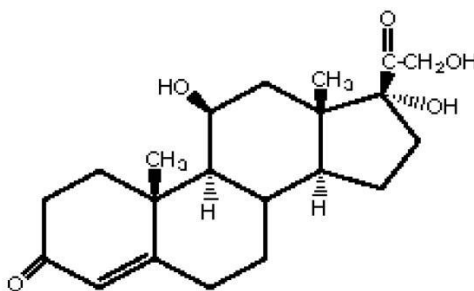
DESCRIPTION

Le Cortisol ELISA kit est un dosage immuno-compétitif pour la détermination quantitative du cortisol dans des fluides biologiques. Veuillez lire le manuel du kit avant d'effectuer ce test. La mesure du cortisol s'effectue grâce à un anticorps monoclonal capable de lier, de manière compétitive, soit le cortisol dans un échantillon ou le cortisol conjugué de manière covalent à une molécule de phosphatase alcaline. Après une incubation simultanée à température ambiante, les réactifs en excès sont éliminés et le substrat est ajouté. Après un court temps d'incubation, la réaction enzymatique est arrêtée et la couleur jaune générée est lue à l'aide d'un lecteur à microplaques à 405nm. L'intensité de la couleur jaune est inversement proportionnelle à la concentration de cortisol dans les standards ou dans les échantillons. La densité optique mesurée est utilisée pour calculer la concentration de cortisol. Pour plus d'explications sur les principes et l'utilisation des immuno-essais, veuillez consulter les livres de Chard¹ ou Tijssen².

INTRODUCTION

Le cortisol (hydrocortisone, composé F) est une hormone stéroïde synthétisée à partir du cholestérol. Il s'agit du glucocorticoïde principal produit et sécrété par le cortex surrénal. Le cortisol se trouve dans le sang soit en tant que cortisol libre, soit lié aux globulines se liant aux corticostéroïdes^{3,4}. Les niveaux sériques sont plus élevés en début de matinée et diminuent ensuite tout au long de la journée³. Le cortisol est impliqué principalement dans des actions métaboliques et immunologiques. Dans l'aspect métabolique, il favorise la gluconéogenèse, le dépôt de glycogène dans le foie et la réduction de l'utilisation du glucose³. Au niveau immunologique, le cortisol fonctionne comme un anti-inflammatoire important et joue un rôle dans l'hypersensibilité, l'immunosuppression et la résistance aux maladies³. Les niveaux plasmatiques de cortisol augmentent également en réponse au stress^{3,9}. Des niveaux anormaux de cortisol sont testés pour établir des corrélations avec une variété de conditions différentes telles que le cancer de la prostate⁵, la dépression⁶, la schizophrénie⁷. Enfin, un excès de cortisol dans tous les tissus corporels est la cause du syndrome de Cushing⁸.

CORTISOL



AVERTISSEMENTS ET PRÉCAUTIONS DE SÉCURITÉ

STRICTEMENT POUR LA RECHERCHE. NE PAS UTILISER POUR LE DIAGNOSTIQUE.

Certains composants du kit contiennent de l'azide pouvant réagir avec la plomberie à base de plomb ou de cuivre. Lors de l'élimination des réactifs, utilisez de larges volumes d'eau afin d'éviter l'accumulation d'azide.

- La Solution Stop est une solution à base de phosphate tri-sodium. Il s'agit d'une solution caustique et doit être utilisée avec précautions.
- L'activité de la phosphatase alcaline du conjugué dépend de la présence d'ions Mg^{2+} et Zn^{2+} . L'activité de ce conjugué est affectée par les concentrations de chélateurs tels que l'EDTA et l'EGTA (> 10mM).
- Nous testons les performances de ce kit avec une variété d'échantillons. Cependant, il est possible que des niveaux élevés de substances interférentes provoquent des variations dans les résultats d'analyse.
- Le standard cortisol fourni, référence catalogue 80-0677, est fourni dans un tampon à base d'éthanol à un pH optimisé pour maintenir son intégrité. Des précautions doivent être prises lors de la manipulation de ce composant du fait des effets connus et inconnus des stéroïdes.

MATÉRIELS FOURNIS

1. **Plaque de micro-titrage coâtée avec un anticorps de chèvre anti-IgG de souris, une plaque 96-puits, référence catalogue 80-0050.** La plaque est constituée de colonnes sécables de 8 puits.
2. **Conjugué pour le Cortisol ELISA kit, 5ml, référence catalogue 80-0680.** Une solution bleue de cortisol conjugué à de la phosphatase alcaline.
3. **Anticorps pour le Cortisol ELISA kit, 5ml, référence catalogue 80-0678.** Une solution jaune d'un anticorps monoclonal de souris anti-cortisol.
4. **Tampon d'essai, 27ml, référence catalogue 80-0010.** Une solution saline tamponnée au Tris contenant des protéines et de l'azide de sodium pour conservateur.
5. **Tampon concentré de lavage, 27ml, référence catalogue 80-1286.** Une solution saline Tris tamponnée contenant des détergents.
6. **Standard de cortisol, 0.5ml, référence catalogue 80-0677.** Une solution de 1×10^5 pg/ml de cortisol.
7. **Réactif de déplacement de stéroïdes, 1ml, référence catalogue 80-0120.** Un réactif spécialement formulé pour inhiber les liaisons des stéroïdes aux protéines.
8. **Substrat pNpp, 20ml, référence catalogue 80-0075.** Une solution tamponnée et prête à l'emploi de pNpp.
9. **Solution Stop, 5ml, référence catalogue 80-0247.** Une solution aqueuse de phosphate tri-sodium. La bouteille doit être bien fermée. Attention : caustique.
10. **Feuille de dosage du cortisol, une par kit, référence catalogue 30-0145.**
11. **Plastique autocollant pour sceller la plaque, un par kit, référence catalogue 30-0012.**

STOCKAGE

Tous les composants de ce kit sont stables à 4°C jusqu'à la date d'expiration du kit.

AUTRES MATÉRIELS NÉCESSAIRES

1. Eau déionisée ou distillée.
2. Des pipettes de précision pour des volumes compris entre 5µl et 1ml.
3. Pipettes répétitives pour la distribution de 50µl et 200µl.
4. Becker jetable pour diluer les tampons concentrés.
5. Cylindres gradués.
6. Agitateur de microplaque.
7. Papier adsorbant.
8. Lecteur de microplaques capable de lire à 405nm, de préférence avec une correction entre 570 et 590nm.

MANIPULATION DES ÉCHANTILLONS

Le Cortisol ELISA kit est compatible avec des échantillons de cortisol provenant d'une variété de matrices différentes. Les échantillons suffisamment dilués dans le tampon d'essai peuvent être lus directement à partir de la courbe standard. Veuillez-vous référer aux données de rendement à la page 16 afin d'obtenir des dilutions appropriées pour vos échantillons. Cependant, l'utilisateur doit vérifier que les dilutions recommandées sont appropriées pour leurs échantillons.

Inclus avec le kit est le réactif de déplacement de stéroïdes qui doit être ajouté à des échantillons de sérum, de plasma et d'autres échantillons contenant des protéines liant des stéroïdes. Les échantillons doivent être dilués avec 1 volume du réactif de déplacement de stéroïdes pour 99 volumes de votre échantillon. Les échantillons contenant de l'IgG de souris peuvent interférer avec le dosage.

Les échantillons dans la majorité des milieux de culture peuvent également être directement analysés, à condition que les standards aient été dilués dans le milieu de culture au lieu du tampon d'essai. Il y aura un petit changement dans la liaison associée à l'analyse des standards et des échantillons dans le milieu de culture. Les utilisateurs ne doivent utiliser que des courbes standards générées dans un milieu de culture ou le tampon d'essai pour calculer les concentrations de cortisol dans la matrice appropriée.

Certains échantillons peuvent avoir des niveaux très faibles de cortisol et une extraction peut être nécessaire pour une mesure plus précise. Une procédure d'extraction appropriée est décrite ci-dessous:

MATÉRIEL REQUIS

1. Standard de cortisol pour déterminer l'efficacité de l'extraction.
2. Ether diéthylique de qualité ACS
3. Tubes à essai en verre

PROTOCOLE D'EXTRACTION

1. Ajoutez suffisamment de cortisol à un échantillon type pour déterminer l'efficacité de l'extraction.
2. Dans une hotte aspirante, ajoutez 1ml d'éther diéthylique pour chaque ml d'échantillon. Fermez le tube et secouez.
3. Laissez les couches aqueuses et organiques se séparer. Pipetez soigneusement la couche éther supérieure et la placer dans un tube à essai propre.
4. Répétez les étapes 2 et 3 deux fois, en combinant les couches d'éther.
5. Evaporez l'éther sous azote.
6. Dissolvez le cortisol extrait avec au moins 250µl de tampon d'essai et vortexez bien. Laissez reposer pendant cinq minutes à température ambiante. Vortexez de nouveau et laissez l'échantillon reposer pendant cinq minutes à température ambiante une deuxième fois pour assurer une reconstitution complète.
7. Analysez immédiatement les échantillons reconstitués ou gardez les échantillons secs congelés à -20°C après dessiccation.

REMARQUES POUR LA PROCÉDURE

1. Ne pas mélanger les composants de différents lots de kit ou utiliser des réactifs au-delà de la date d'expiration du kit.
2. Laissez tous les réactifs se réchauffer à température ambiante pendant au moins 30 minutes avant utilisation.
3. Les standards peuvent être préparés dans des tubes en verre ou en plastique.
4. Pré-rincez la pipette avec un réactif, utiliser de nouveaux cônes pour chaque échantillon, standard et réactif.
5. Pipetez les standards et les échantillons au fond des puits.
6. Ajoutez les réactifs sur le côté du puits pour éviter toute contamination.
7. Ce kit utilise des colonnes sécables, ce qui permet à l'utilisateur de mesurer autant d'échantillons que désirés. Les puits inutilisés doivent être conservés desséchés à 4°C dans le sac scellé fourni avec le kit. Les puits doivent être utilisés dans le cadre fourni.
8. **Il faut prendre soin de minimiser la contamination par la phosphatase alcaline endogène.** La contamination de l'activité de la phosphatase alcaline, en particulier dans la solution du substrat, peut conduire à des blancs élevés. Il faut prendre soin de ne pas toucher à mains nues les pointes de pipettes et d'autres objets qui sont utilisés lors de l'analyse.
9. **Avant l'addition du substrat, assurez-vous qu'il n'y a pas de tampon de lavage résiduel dans les puits. Tout tampon de lavage restant peut entraîner une variation des résultats d'analyse.**

PRÉPARATION DES RÉACTIFS

1. **Standard de cortisol** : Laissez la solution standard de Cortisol de 1×10^5 pg/ml se réchauffer à température ambiante. Marquez sept tubes en verre de 12 x 75 mm de 1 à 7. Pipetez 1000 μ l de diluant standard (tampon d'essai ou milieu de culture) dans le tube n°1. Pipetez 500 μ l de diluant standard dans les tubes numérotés de 2 à 7. Retirez 100 μ l de diluant du tube n°1. Ajoutez 100 μ l du standard de 1×10^5 pg/ml au tube n°1. Vortexez. Ajoutez 500 μ l du tube n°1 au tube n°2 et vortexez. Ajoutez 500 μ l du tube n°2 au tube n°3 et vortexez. Continuez ceci pour les tubes n°4 à n°7. La concentration de Cortisol dans les tubes n°1 à n°7 sera respectivement de 10000, 5000, 2500, 1250, 625, 313 et 156pg/ml. Voir la feuille de dosage du cortisol pour connaître les détails de la dilution. Les standards dilués doivent être utilisés dans les 60 minutes suivant la préparation.
2. **Tampon de lavage** : Préparez le tampon de lavage en diluant 5ml du concentré fourni avec 95ml d'eau déionisée. Ce tampon peut être conservé à température ambiante jusqu'à la date d'expiration du kit, ou pendant 3 mois, selon la première éventualité.

PROTOCOLE

Laissez tous les réactifs à température ambiante pendant au moins 30 minutes avant leur utilisation. Tous les standards et les échantillons doivent être dupliqués.

1. Reportez-vous à la feuille de dosage du cortisol pour déterminer le nombre de puits à utiliser et placez les puits restants avec le déshydratant dans le sac scellé fourni avec le kit et scellez le sac. Conservez les puits inutilisés à 4°C.
2. Pipetez 100µl de diluant standard (tampon d'essai ou milieu de culture) dans les puits NSB et Bo (0pg/ml standard).
3. Pipetez 100µl des standards 1 à 7 dans les puits appropriés.
4. Pipetez 100µl des échantillons dans les puits appropriés.
5. Pipetez 50µl de tampon d'essai dans les puits NSB.
6. Pipetez 50µl de conjugué bleu dans chaque puits, à l'exception de l'activité totale (TA) et des puits Blank.
7. Pipetez 50µl d'anticorps jaune dans chaque puits, à l'exception des puits Blank, TA et NSB. **REMARQUE:** Tout puits utilisé doit être de couleur **verte**, à l'exception des puits NSB qui doivent être **bleus**. Les puits Blank et TA sont vides à ce stade et n'ont aucune couleur.
8. Incubez la plaque à température ambiante sur un agitateur de plaques pendant 2 heures à ~ 500 tours par minute. La plaque peut être recouverte avec le scellant de plaque fourni, si désiré.
9. Videz le contenu des puits et lavez-les en ajoutant 400µl de solution de lavage à chaque puits. Répétez le lavage 2 fois de plus pour un total de 3 lavages.
10. Après le lavage final, videz ou aspirez les puits, et appuyez fermement sur la plaque sur une serviette en papier sans peluches pour éliminer tout tampon de lavage restant.
11. Ajoutez 5µl du conjugué bleu aux puits TA.
12. Ajoutez 200µl de la solution de substrat pNpp à chaque puits. Incubez à température ambiante pendant 1 heure sans agitation.
13. Ajoutez 50µl de solution d'arrêt à chaque puits. Cela arrête la réaction et la plaque doit être lue immédiatement.
14. Lisez la densité optique à 405nm, de préférence avec une correction entre 570 et 590nm. Soustrayez la densité optique moyenne des puits Blank de toutes les lectures.

CALCUL DES RÉSULTATS

Plusieurs options sont disponibles pour le calcul de la concentration de cortisol dans vos échantillons. Nous recommandons que les données soient traitées par un logiciel de dosage immunologique utilisant un programme d'ajustement de courbe logistique à 4 paramètres (4PL). Si ce type de logiciel de réduction de données n'est pas disponible, la concentration de cortisol peut être calculée comme suit :

1. Calculez la densité optique moyenne (DO) pour chaque standard et échantillon en soustrayant la DO moyenne de NSB de la DO moyenne du standard ou de l'échantillon : $DO \text{ moyenne} = DO \text{ moyenne standard ou échantillon} - DO \text{ moyenne NSB}$.
2. Calculez le pourcentage de liaison de chaque duplicata de vos standards par rapport à la liaison maximum (B_0), en utilisant la formule suivante : $\text{Pourcentage de liaison} = (DO \text{ moyenne standard} / DO \text{ moyenne } B_0) \times 100$.
3. Tracez la courbe standard (x : concentration de cortisol, y : pourcentage de liaison). La concentration de cortisol dans vos échantillons peut être déterminée par interpolation à partir de la courbe standard.

Les échantillons avec des concentrations en dehors de la courbe standard devront être ré-analysés en utilisant une dilution différente.

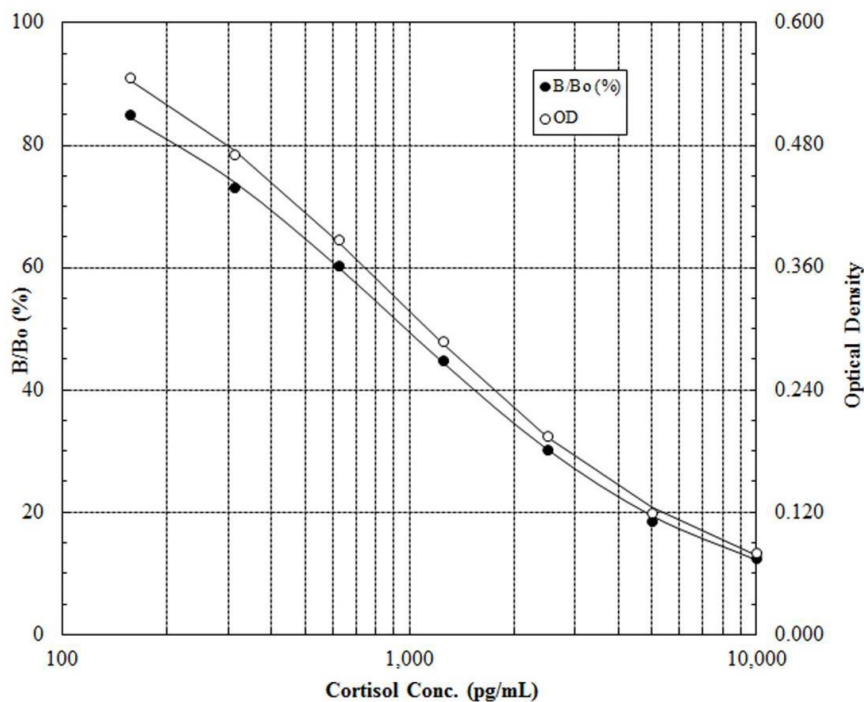
EXEMPLE DE RÉSULTATS

Les résultats présentés ci-dessous sont uniquement à titre d'illustration et ne doivent en aucun cas être utilisés pour calculer vos résultats.

Puits	DO moyenne (- Blank)	DO moyenne nette	Pourcentage de liaison	Cortisol (pg/ml)
Blank	(0.093)			
TA	0.090			
NSB	-0.002	0.000	0.0%	
Bo	0.641	0.643	100%	0
S1	0.079	0.081	12.6%	10,000
S2	0.118	0.120	18.7%	5,000
S3	0.193	0.195	30.3%	2,500
S4	0.286	0.288	44.7%	1,250
S5	0.386	0.388	60.3%	625
S6	0.469	0.471	73.3%	313
S7	0.545	0.547	85.0%	156
Inconnu 1	0.212	0.214	33.3%	2,128
Inconnu 2	0.408	0.410	63.8%	525

EXEMPLE DE COURBE STANDARD

Veillez trouver ci-dessous un exemple de courbe standard. Cette dernière ne doit pas être utilisée pour calculer les concentrations de cortisol dans vos échantillons. Chaque utilisateur doit effectuer une courbe standard pour chaque essai.



Exemple de paramètres de contrôle qualité

Activité totale ajoutée = $0.090 \times 10 = 0.90$

% NSB = -0.223%

% Bo / TA = 71.84%

Valeur de corrélation = 1.00

Interception à 20% = 4769pg/ml

Interception à 50% = 976pg/ml

Interception à 80% = 218pg/ml

SPÉCIFICATIONS

Les paramètres suivants pour ce kit ont été déterminés en utilisant les directives énumérées dans les protocoles d'évaluation du National Committee for Clinical Laboratory Standards (NCCLS).

Sensitivité

La sensibilité a été calculée en déterminant la densité optique moyenne pour 16 puits Bo et comparée à la densité optique moyenne pour 16 puits standard n°7. La limite de détection a été déterminée comme la concentration de cortisol mesurée à deux écart-types par rapport à zéro selon la courbe standard.

Densité optique moyenne pour Bo = 0.791 ± 0.020 (2,3%)

Densité optique moyenne pour standard n°7 = 0.681 ± 0.024 (3,1%)

Densité optique delta (0-156pg/ml) = 0.110

2 écart-types du standard zéro 2×0.020 = 0.040

Sensitivité $0.040/0.010 \times 156,0\text{pg/ml}$ = 56.72pg/ml

Linéarité

Un échantillon contenant 7789pg /ml de cortisol a été dilué 5 fois 1 dans 2 dans le tampon d'essai et mesuré avec le cortisol ELISA kit. Les données ont été tracées graphiquement en tant que concentration réelle de cortisol par rapport à la concentration mesurée de cortisol. La courbe obtenue avait une pente de 1,046 et un coefficient de corrélation de 0,999.

Précision

La précision intra-essai a été déterminée en prenant des échantillons contenant des concentrations faibles, moyennes et élevées de cortisol et en analysant ces échantillons à plusieurs reprises (n = 16) lors du même dosage. La précision inter-essai a été déterminée en mesurant trois échantillons avec des concentrations faibles, moyennes et élevées de cortisol à plusieurs reprises (n = 8).

Les précisions énumérées ci-dessous représentent le pourcentage de coefficient de variation pour les concentrations de cortisol déterminées dans ces essais et calculées à partir d'une courbe logistique à 4 paramètres.

	Cortisol (pg/ml)	% CV intra-essai	% CV inter-essai
Faible	333	10.5	
Moyenne	1088	6.6	
Elevée	3155	7.3	
Faible	451		13.4
Moyenne	969		7.8
Elevée	3052		8.6

Cross-réactivité

Les cross-réactivités pour un certain nombre de composés stéroïdiens apparentés ont été déterminées en dissolvant le cross-réactif (pureté vérifiée par NMR et autres méthodes analytiques) dans le tampon d'essai à des concentrations de 1×10^5 à 10pg/ml. Ces échantillons ont ensuite été analysés avec le cortisol ELISA kit et la concentration de cortisol à 50% de B/Bo a été calculée. Le pourcentage de cross-réactivité a été déterminé par comparaison avec la concentration réelle du cross-réactif dans l'échantillon et exprimé en pourcentage.

Composé	Cross-réactivité
Cortisol	100%
Prednisolone	122.35%
Corticosterone	27.68%
11-deoxycortisol	4.00%
Progesterone	3.64%
Prednisone	0.85%
Testosterone	0.12%
Androstenedione	< 0.1%
Cortisone	< 0.1%
Estradiol	< 0.1%

RENDEMENT POUR DIFFÉRENTS ÉCHANTILLONS

Les concentrations de cortisol ont été mesurées dans une variété d'échantillons différents, y compris du milieu de culture, de la salive et de l'urine humaine, ainsi que du plasma et du sérum porcin. Pour les échantillons dans du milieu de culture, assurez-vous que les standards ont été dilués dans le même milieu de culture (voir page 6). Le cortisol a été ajouté dans des échantillons non dilués qui ont ensuite été dilués avec le tampon d'essai puis testés avec le cortisol ELISA kit. Les résultats suivants ont été obtenus:

Echantillon	Rendement*	Dilution recommandée*
Milieu de culture	106.6%	Net
Salive humaine	97.4%	≥ 1 : 4
Urine humaine	102.2%	Net
Plasma porcin	103.8%	≥ 1 : 8
Sérum porcin	106.1%	≥ 1 : 8

* : Voir la section sur la manipulation des échantillons pour plus de détails (page 6).

RÉFÉRENCES

1. T. Chard, "An Introduction to Radioimmunoassay & Related Techniques 4th Ed", (1990) Amsterdam: Elsevier.
2. P. Tijssen, "Practice & Theory of Enzyme Immunoassays", (1985) Amsterdam: Elsevier.
3. E. Friess, *et al.*, Eur J Clin Invest, (2000) 30 Suppl 3:46-50.
4. C. Longscope., J Endocrinology, (1996) 150 Suppl: S125-S127.
5. J. Herbert, Lancet, (1995) 345:1193-1194.
6. A. Michael, *et al.*, Biol. Psychiatry, (2000) 48(10): 989-95.
7. C.R. Dequet and D.J. Wallace, Current Opin Invest Drugs, (2001) 8: 1045-53.
8. W.M. Jeffries, Med Hypotheses, (1998) 51(2):111-4.
9. National Committee for Clinical Laboratory Standards Evaluation Protocols, SC1, (1989) Villanova, PA: NCCLS.