

## 人超敏 C 肽定量检测试剂盒（酶联免疫法）说明书 V8.0

即用

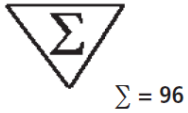




10-1141-01

96 人份试剂



由瑞典 Mercodia AB 制造

用于标签上的标识的说明

	96 测试试剂
	失效日期
	在 2-8℃下储存
	批号
	用于体外诊断

## 预期用途

超敏 C 肽定量检测试剂盒（酶联免疫法）提供了一种人血清、血浆、尿液样本中 C 肽的定量检测方法。

## 本试验综述和说明

胰岛  $\beta$  细胞功能的定性与定量评估不仅用于糖尿病自然历史的诊前和诊后研究，也在临床上作为选择正确疗法的导向。外周胰岛素不能用于评估  $\beta$  细胞功能，鉴于门静脉循环使得肝脏吸收的大量化和复杂化，并且胰岛素试验不能区分内源性胰岛素和外源性胰岛素。

胰岛  $\beta$  细胞内的胰岛素原可裂解为 1 分子的 C 肽和 1 分子的胰岛素，C 肽以和胰岛素等摩尔浓度量释放到循环中，相比胰岛素而 C 肽最低限度被肝脏吸收，因此，外周 C 肽浓度更能反映  $\beta$  细胞的分泌量，比胰岛素更准确。

## 检测程序的原理

超敏 C 肽检测试剂盒（酶联免疫法）是一种固相双表位酶联免疫试剂。它基于双夹心技术，两单克隆抗体分别结合在 C 肽分子的抗原决定簇上。在孵育过程中，样本中的 C 肽与结合在微孔(板)中的 C 肽抗体和酶标 C 肽抗体反应。洗涤移去非结合的酶标抗体。结合的偶联物(标记物)通过与 3,3',5,5'-四甲基联苯胺（TMB）反应而被检测到。加入酸后反应终止，然后通过分光光度计（酶标仪）读取反应的终点。

## 警告与注意事项

- 用于体外诊断。
- 不能让反刍动物或猪接触到本试剂盒的内容物及其残余物。
- 本试剂盒的终止溶液含有 0.5M 的硫酸。按常规预防措施处理危险化学品。
- 所有的患者样本都应按潜在传染物处理。

## 要求但未提供的材料

- 配备相应的移液管（重复移取加入酶结合物溶液、试验缓冲液、TMB 底物和终止溶液）
- 用于试剂制备的试管、烧杯和量筒
- 重蒸水
- 磁力搅拌器
- 涡轮混合器
- 酶标仪（含 450nm 滤光片）
- 平板振荡器（建议速率 700-900 循环/分钟，轨道运动）
- 微孔板（酶标板）洗涤设备

## 试剂

各 Merckodia 胰岛素 ELISA 检测试剂盒 (10-1141-01) 都包含 96 孔的试剂, 足够用于双份测试的 42 个样本、1 个校准曲线。对于更大量的试验, 用标有相同批号的试剂混池使用。失效日期见外包装盒, 建议储存温度为 2-8°C。

<b>包被微孔板</b>	1 个平板	96 孔板	准备好使用
小鼠单克隆抗胰岛素		8 孔的条	
对于未使用过的微板条, 用胶带重新密封在袋子里, 储存在 2-8°C, 在 8 周内使用。			
<b>校准品 1、2、3、4、5</b>	5 瓶	1000µL	冻干粉
黄色			每瓶加入 1000µL 重
浓度标示在瓶标签上			蒸水稀释
校准液配制储存: 在 2-8°C, 1 周; 在 -20°C, 超过一周。			
<b>校准品 0</b>	1 瓶	5 mL	准备好使用
黄色			
<b>试验缓冲液</b>	1 瓶	6mL	准备好使用
红色			
<b>酶结合物 11×</b>	1 瓶	1.2mL	制备, 见下文
过氧化物酶结合的鼠抗单克隆抗体			
<b>酶结合物缓冲液</b>	1 瓶	12mL	准备好使用
蓝色			
<b>洗涤缓冲液 21×</b>	1 瓶	50 mL	制备 1×的洗涤缓冲
			液需加入 1000mL 重
稀释后储存: 2-8°C, 8 周			蒸水稀释
<b>底物 TMB</b>	1 瓶	22mL	准备好使用
无色溶液			
注意! 光敏!			
<b>终止溶液</b>	1 瓶	7mL	准备好使用
0.5M 硫酸			

## 酶结合物 1×溶液的制备

按下表，用酶结合物缓冲液稀释酶结合物 11× (1+10)，来制备所需体积的酶结合物 1×溶液。当为整个平板制备酶结合物 1×溶液时，将所有酶结合物缓冲液倒入酶结合物 11×瓶中，轻柔混合。

条数量	酶结合物 11×	酶结合物缓冲液
12 条	1 瓶	1 瓶
8 条	700 μL	7.0 mL
6 条	500 μL	5.0 mL
4 条	350 μL	3.5 mL

稀释后储存：2-8℃一个月

## 样本的收集和处理

### 血清

通过静脉穿刺收集血液，允许结块，然后通过离心分离血清。样本可以在 2-8℃下储存至 3 天。对于更长时间，样本应储存在-20℃。避免反复冻融。

### 血浆

通过静脉穿刺将血液收集在含肝素、柠檬酸盐或 EDTA 抗凝血剂的试管里，分离血浆成分。样本可以在 2-8℃下储存至 3 天。对于更长时间，样本应储存在-20℃。避免反复冻融。

### 尿液

收集 24 小时尿液(无防腐剂)，样本保存在 2-8℃，记录样本的总体积和保持整除混合，以便分析。使用前，样品在 2-8℃最多储存 24 小时，为了更长时间，可以保存-70℃。避免反复冻融，细胞碎片在试验前可以过滤、离心除去。

## 样本的制备

尿液，试验前，用校准品 0 体积比 1/10 倍稀释。

## 检测步骤

在使用前，所有的试剂和样本都应放至室温。

每次试验都要做一个标准曲线。

1. 制备酶结合物 1×溶液、洗涤缓冲液 1×溶液。
2. 制备足够用于平行测试 2 次的校准品、质控品和样本的包被微孔(板)。
3. 各吸取 25μL 各水平校准品、质控品、样本到适当的孔中。

4. 向各孔中加入 50 $\mu$ L 试验缓冲液。
5. 将上述微孔板放入平板振荡器（700-900rpm）在室温下（18-25 $^{\circ}$ C）温育 1 小时。
6. 用带有 overflow 洗涤功能的全自动洗板机, 每孔用 700 $\mu$ L 洗涤缓冲液 1 $\times$ 溶液洗涤 6 次。  
在洗涤程序中不包括浸泡步骤。

或手工洗涤:

将微板倒置在一个水槽上以弃去反应溶液。向每孔加入 350 $\mu$ L 洗涤缓冲液 1 $\times$ 溶液。弃去洗涤溶液, 靠在吸水纸轻拍数次以除去多余的液体。重复 5 次。在洗涤过程中避免长时间浸泡。

7. 向各孔中加入 100  $\mu$ L 酶结合物 1 $\times$ 溶液。
8. 微孔板放入平板振荡器（700-900rpm）在室温下（18-25 $^{\circ}$ C）温育 1 小时。
9. 重复操作第 6 步。
10. 加入 200 $\mu$ L 底物 TMB。
11. 在室温下（18-25 $^{\circ}$ C）温育 15 分钟。
12. 加入 50 $\mu$ L 终止溶液。将平板放入振荡器 5 秒以确保混匀。
13. 在 450nm 下读取光密度值并计算结果。  
在 30 分钟内读数。

注意! 防止结合物和底物之间的污染, 建议单独使用移液器。

## 内部质量控制

对于商品质控品如 Mercodia 糖尿病抗原质控试剂盒（10-1134-01/10-1164-01）和/或含有低、中和高浓度 C 肽的内部血清池, 应该像检测未知样本一样进行日常检测, 并每天记录结果。对各试验的以下数据进行记录是良好的实验室规范: 试剂盒批号、试剂盒组分稀释液和/或重悬日期、空白（样本缓冲液）、校准品和质控品的 OD 值。

实验室质量控制频率应遵循政府法规或认证要求。

## 结果的计算

### 计算机计算

由计算机数据获得除校准品 0 以外的校准品的 C 肽浓度, 使用三次样条回归而得的浓度。

## 人工计算

1. 对除校准品 0 以外的校准品的吸收值，相对于 C 肽浓度，绘制 log-log 图，并创建一个校准曲线。
2. 在校准曲线上读取质控品和未知样本的浓度。

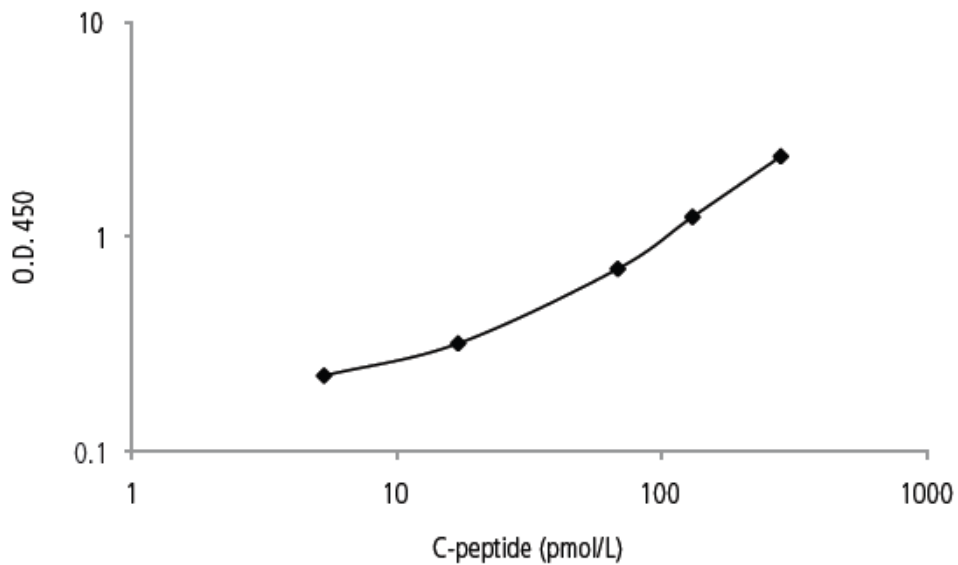
## 结果示例

孔	样本	A <sub>450nm</sub>	浓度 mU/L
1A-B	校准品 0	0.086/0.090	
1C-D	校准品 1*	0.136/0.133	
1E-F	校准品 2*	0.237/0.237	
1G-H	校准品 3*	0.702/0.728	
2A-B	校准品 4*	1.405/1.419	
2C-D	校准品 5*	2.862/2.945	
2E-F	样本 1	0.193/0.204	14
2G-H	样本 2	0.374/0.391	35
3A-B	样本 3	0.980/0.951	97

\*瓶标签上显示的浓度

## 校准曲线示例

典型的校准曲线如下所示。不要使用本曲线来确定实际试验结果。



## 程序的局限性

正如所有的诊断测试，一个确定的诊断不能仅基于单一的测试结果，而是由医生在所有临床发现评估后做出。高血脂、黄疸或溶血样本不会对本试验造成影响。

## 期望值

良好的规范决定了每个实验室要建立他们自己的期望值范围。在实验室收集到足够的数  
据前，以下结果可以做为一个指南。

数据来源 136 例健康空腹个体，检测值 742 pmol/l (2.2 µg/L)，中值为 628 pmol/L (1.9 µg/L)  
和一个范围 343–1803 pmol/L (1.0–5.4 µg/L)，95%的观察值位于范围中心。

## 性能指标

### 检出限

检出限是按照 ISO11843 第 1 部分检测能力来确定的。检测能力应被视为试验方法确证  
的一部分，而不是能够检测到的最低浓度。

按照 ISO11843 第 4 部分所述的方法，确定了检出限是 2.5 pmol/L (0.0076 µg/L)。

吸收值低于校准品 1 的样本浓度不需计算，但应表述为小于或等于 ( $\leq$ ) 校准品 1 瓶子  
上标示的浓度值。

### 回收率

加入的回收率为 93-103% (平均值为 104%)

稀释的回收率为 92-111% (平均值 101%)

### 钩状效应

当样本浓度大于 36 nmol/L 时，亦能检测出来，不出现假低的结果。

### 精密度

对来自 5 个不同地点的样本进行 4 个重复试验。



样本	平均值 pmol/L	批内%	变异系数%	
			批间%	总体%
1	37	3.8	5.5	6.7
2	60	2.6	4.2	5.0
3	143	2.5	1.6	2.9

### 特异性

Insulin	<0.0006%
Proinsulin	<1.8%
Proinsulin des(31-32)	3%
Proinsulin split(32-33)	2%
Proinsulin des(64-65)	74%
Proinsulin split(65-66)	10%

### 校准

Mercodia C 肽 ELISA 试剂盒依据 C 肽国际参考准备, IRR C 肽 84/510 校正。

### 单位换算

1 $\mu$ g/L=331 pmol/L

### 保证

在此发布的性能数据是按指定的程序操作获得的。任何非 Merckodia AB 建议的对程序的变更或修改都可能会影响试验结果, 在这种情况下, Merckodia AB 会放弃所有明示的、隐含的或法定的保证, 包括使用的适销性或适合性的隐含的保证。在这种事件中, Merckodia AB 及其授权分销商, 不对由此引发的间接损害负责。

### 参考文献

Craig ME, Howard NJ, Silink M, Rawlinson WD (2003) Reduced frequency of HLA DRB1\*03-DQB1\*02 in children with type 1 diabetes associated with enterovirus RNA. J Infect Dis 187:1562-1570

Gaines-Das RE and Bristow AF (1988) WHO International reference reagents for human proinsulin and human C-peptide. J Biol Stand 16:179-186

更多更新文献可以链接网站: [www.mercodia.com.cn](http://www.mercodia.com.cn)

## 方案概要表

### 同工胰岛素 ELISA 试剂盒

加入校准品、质控品和样本	25 $\mu$ L
加入试验缓冲液	50 $\mu$ L
温育	在 18-25 $^{\circ}$ C 下,平板振荡器振荡 1 小时(700-900 rpm)
用洗涤缓冲液 1 $\times$ 洗涤平板	700 $\mu$ L,6 次
加入酶结合物 1 $\times$ 工作液	100 $\mu$ L
温育	在 18-25 $^{\circ}$ C 下,平板振荡器振荡 1 小时(700-900 rpm)
用洗涤缓冲液 1 $\times$ 洗涤平板	700 $\mu$ L,6 次
加入底物 TMB	200 $\mu$ L
温育	在 18-25 $^{\circ}$ C 下 30 分钟
加入终止溶液	50 $\mu$ L 振荡 5 秒钟以确保混匀
在 A <sub>450</sub> 下测量	450 <sub>nm</sub>

未提供质控品

全部细节参见第 6 页

31-3126

Version 8.0