

人同工胰岛素定量检测试剂盒（酶联免疫法）说明书 V12.0

即用

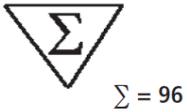
10-1128-01

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

同工胰岛素定量检测试剂盒（酶联免疫法）提供了一种人血清或血浆样本中胰岛素的定量检测方法。

本试验综述和说明

在胰岛 β 细胞内合成的胰岛素是调控糖代谢的主要激素。胰岛素前体—胰岛素原生成 C 肽和胰岛素。等摩尔质量分泌到门静脉循环。成熟的胰岛素分子由 2 条多肽链组成（A 链、B 链，分别由 21 个和 30 个氨基酸组成），A、B 链间由 2 个二硫键连接，并且 A 链内存在 1 个二硫键。

胰岛素的分泌主要由血糖浓度控制，该激素还参与许多重要的代谢活动。它的机制功能是在外周组织中通过运糖载体来控制糖的吸收和利用。和其它降血糖代谢活动抑制肝糖异生和通过升血糖素（胰高血糖素、肾上腺素、生成激素和皮质醇）抵消肝糖分解。

胰岛素依赖型糖尿病或垂体机能减退症的患者体内胰岛素浓度严重降低。胰岛素升高的情况出现在非胰岛素依赖型糖尿病、肥胖症、胰岛瘤、内分泌功能失调（库兴氏综合症、肢端肥大症）的患者。

检测程序的原理

同工胰岛素检测试剂盒（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胰岛素分子的抗原决定簇上。在孵育过程中，样本中的胰岛素与结合在微孔(板)中的抗胰岛素抗体和酶标抗胰岛素抗体反应。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

- 10 μ L、20 μ L、100 μ L、200 μ L、1000 μ L 移液管（重复移取加入酶结合物溶液、TMB 底物和终止溶液）
- 用于试剂制备的烧杯和量筒
- 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（10-1128-01）都包含 96 孔的试剂，足够用于双份测试的 43 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。

| | | | |
|--|-------|--------|-----------------------------|
| 包被微孔板 | 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。 | | | |
| 校准品 1、2、3、4、 | 4 瓶 | 1000µL | 准备好使用 |
| 重组人胰岛素 | | | |
| 黄色 | | | |
| 浓度标示在瓶标签上 | | | |
| 校准品 0 | 1 瓶 | 5 mL | 准备好使用 |
| 黄色 | | | |
| 酶结合物 11× | 1 瓶 | 600µL | 制备，见下文 |
| 过氧化物酶结合的鼠抗 apoB 单克隆抗体 | | | |
| 酶结合物缓冲液 | 1 瓶 | 6mL | 准备好使用 |
| 蓝色 | | | |
| 洗涤缓冲液 21× | 1 瓶 | 50 mL | 制备 1×的洗涤缓冲液需加入 1000mL 重蒸水稀释 |
| 稀释后储存：2-8°C，8 周 | | | |
| 底物 TMB | 1 瓶 | 22mL | 准备好使用 |
| 无色溶液 | | | |
| 注意！光敏！ | | | |

| | | | |
|---------|-----|-----|-------|
| 终止溶液 | 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 | 350μL | 3.5mL |
| 4 条 | 200μL | 2mL |

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 24 小时。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 24 小时。对于更长时间，样本应储存在-20℃。避免反复冻融。

样本的制备

样本含量大于 100mU/L 应稀释。如 V/V 为 1/10 的校准品 0.

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×工作液、洗涤缓冲液 1×工作液。

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 25 μ L 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 μ L 酶结合物 1 \times 工作液。
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 μ 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 μ 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. 加入 200 μ L 底物 TMB。
8. 在室温下 (18-25 $^{\circ}$ C) 温育 15 分钟。
9. 加入 50 μ L 终止溶液。将平板放入振荡器 5 秒以确保混匀。
10. 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 (10-1241-01/) 和/或含有低、中和高浓度胰岛素的内部血清池, 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 以外的校准品的胰岛素浓度, 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，相对于胰岛素浓度，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。

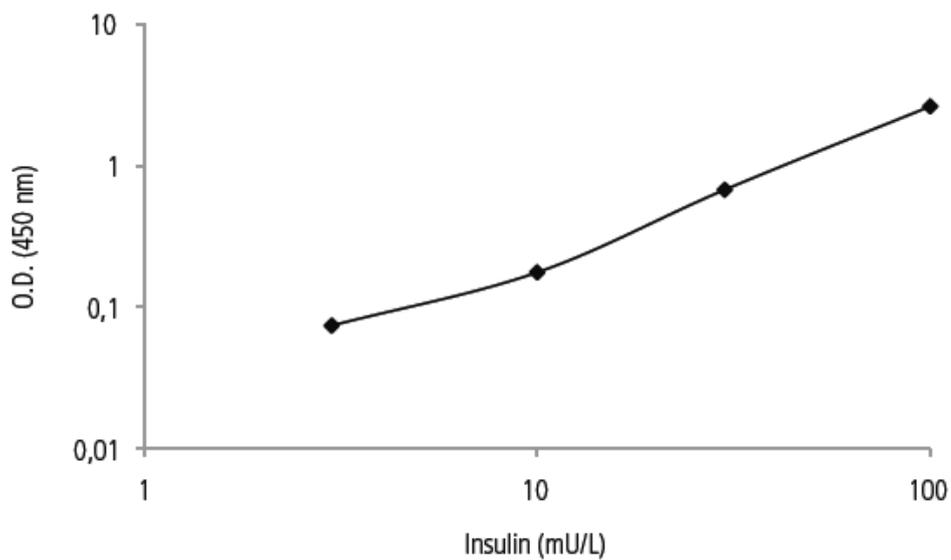
结果示例

| 孔 | 样本 | A _{450nm} | 浓度 mU/L |
|------|--------|--------------------|---------|
| 1A-B | 校准品 0 | 0.066/0.067 | |
| 1C-D | 校准品 1* | 0.084/0.087 | |
| 1E-F | 校准品 2* | 0.161/0.165 | |
| 1G-H | 校准品 3* | 0.595/0.599 | |
| 2A-B | 校准品 4* | 2.377/2.347 | |
| 2C-D | 样本 1 | 0.270/0.272 | 16.4 |
| 2E-F | 样本 2 | 1.146/1.192 | 53.6 |
| 2G-H | 样本 3 | 0.513 | 92.7 |

*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。对于已接受胰岛素治疗的个体试验的应用因具有干扰作用的抗胰岛素抗体的形成变得复杂。

高血脂、黄疸或溶血样本不会对本试验造成影响。但血清、血浆样本中的溶血作用可能因为胰岛素的降解，导致结果值偏低和相对高的批间差异。降解的因素包括时间、温度、血红蛋白浓度。溶血样本需保持低温或置于冰上以防胰岛素的降解。

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 137 例健康空腹个体，检测值为 10mU/L，中值为 7 mU/L 和一个范围(2-25mU/L)，95%的观察值位于范围中心。

性能指标

检出限

按照校准品 0 以上的 2 个标准偏差来计算，检出限为 1mU/L。

回收率

回收率为 101%

钩状效应

样本浓度大于 2000mU/L 都可检测出来，不出现假低的结果。

精密度

对来自 8 个不同地点的样本进行 4 个重复试验。

| 样本 | 平均值 mU/L | 批内% | 变异系数% | |
|----|----------|-----|-------|-----|
| | | | 批间% | 总体% |
| 1 | 15.9 | 3.0 | 3.9 | 4.9 |
| 2 | 53.2 | 2.8 | 3.0 | 4.1 |
| 3 | 90.9 | 3.2 | 3.0 | 4.4 |

特异性

| | |
|----------------|------|
| insulin | 100% |
| Insulin lispro | 89% |
| Insulin aspart | 80% |

| | |
|-------------------------|---------|
| Insulin detemir | 22% |
| Insulin glargin | 44% |
| Insulin glulisine | 100% |
| C-peptide | <0.1% |
| Proinsulin | 54% |
| Proinsulin des(31-32) | 58% |
| Proinsulin split(32-33) | 56% |
| Proinsulin des(64-65) | 66% |
| Proinsulin split(65-66) | 78% |
| IGF- I | < 0.02% |
| IGF-II | < 0.02% |
| Rat insulin | 71% |
| Mouse insulin | 49% |
| Porcine insulin | 306% |
| Ovine insulin | 131% |
| Bovine insulin | 58% |

校准

Mercodia 同工胰岛素 ELISA 试剂盒依据人胰岛素的 1st International Reference Preparation 66/304.

单位换算

1 μ g/L=23 mU/L; 1mU/L=6 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 Mercodia 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，Mercodia 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，Mercodia 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

Hedman CA, Lindstrom T and Arnqvist HJ (2001) Direct comparison of insulin lispro and aspart shows small differences in plasma insulin profiles after subcutaneous injection in type 1 diabetes. Diabetes Care 24:1120-1121

Heise T, Nosek L, Biilmann Ronn B, Endahl L, Heinemann L, Kapitza C and Draeger E (2004) Lower Within-Subject Variability of Insulin Detemir in Comparison to NPH Insulin and Insulin Glargine in People With Type 1 Diabetes. Diabetes 53:1614-1620

Lindstrom T, Hedman CA and Arnqvist HJ (2002) Use of a novel double-antibody technique to describe the pharmacokinetics of rapid-acting insulin analogs. Diabetes Care 25:1049-1054

更多更新文献可以链接网站: 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 μ L |
| 加入酶结合物 1 \times 工作液 | 50 μ 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 μ L ,6 次 |
| 加入底物 TMB | 200 μ L |
| 温育 | 在 18-25 $^{\circ}$ C 下 15 分钟 |
| 加入终止溶液 | 50 μ L 振荡 5 秒钟以确保混匀 |
| 在 A ₄₅₀ 下测量 | 450 _{nm} |

31-3112

Version 12.0