

## 人胰岛素定量检测试剂盒（酶联免疫法）说明书 v9.0

10-1113-01

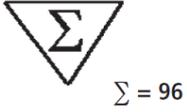
96 人份试剂

10-1113-10

96×10 人份试剂



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

人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

人胰岛素检测试剂盒（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

- 25μL、50μL、100μL、200μL、1000μL 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
- 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 1×96

各 Mercodia 胰岛素 ELISA 检测试剂盒（10-1113-01）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℃。

<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℃，在 8 周内使用。

<b>校准品 1、2、3、4、5</b>	5 瓶	1000μL	准备好使用
重组人胰岛素			
黄色			
浓度标示在瓶标签上			

<b>校准品 0</b>	1 瓶	5 mL	准备好使用
黄色			

<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 apoB 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 重蒸水稀释
稀释后储存：2-8℃，8 周			

<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
4 条	350 μL	3.5 mL

稀释后储存：2-8°C 一个月

## 试剂 10×96

各 Mercodia 胰岛素 ELISA 检测试剂盒 (10-1113-10) 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。

包被微孔板	10 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、5	5 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	12mL	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	120mL	准备好使用
蓝色			
洗涤缓冲液 21×	2 瓶	200 mL	制备 1×的洗涤缓冲液需加入 1000mL 重

稀释后储存：2-8℃，8周

蒸水稀释

---

<b>底物 TMB</b>	1 瓶	220mL	准备好使用
---------------	-----	-------	-------

无色溶液

注意！光敏！

---

<b>终止溶液</b>	1 瓶	70mL	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。轻柔混合，1天内使用。

---

板数量	酶结合物 11×	酶结合物缓冲液
10 个平板	1 瓶	1 瓶
5 个平板	5.0 mL	50 mL
3 个平板	3.0 mL	30 mL
2 个平板	2.0 mL	20 mL
1 个平板	1.0 mL	10 mL

---

### 洗涤缓冲液 1×溶液的制备

按下表，用洗涤缓冲液稀释 21×（1+20），来制备所需体积的洗涤缓冲液 1×溶液。轻柔混合。

---

板数量	洗涤缓冲液 21×	重蒸水
10 个平板	2 瓶	8000mL
5 个平板	180 mL	3600 mL
3 个平板	110 mL	2200 mL
2 个平板	70mL	1400 mL
1 个平板	35 mL	700 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 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

常规不需稀释，样本含量大于 200mU/L 应稀释，用校准品 0 以 1/10 倍体积稀释样本。

## 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 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 50μL 酶结合物 1×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℃）温育 1 小时。
6. 用带有 overflow 洗涤功能的全自动洗板机，每孔用 700μL 洗涤缓冲液 1×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 350μL 洗涤缓冲液 1×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 200μL 底物 TMB。
8. 在室温下（18-25℃）温育 15 分钟。
9. 加入 50μL 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（10-1134-01/10-1164-01）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。

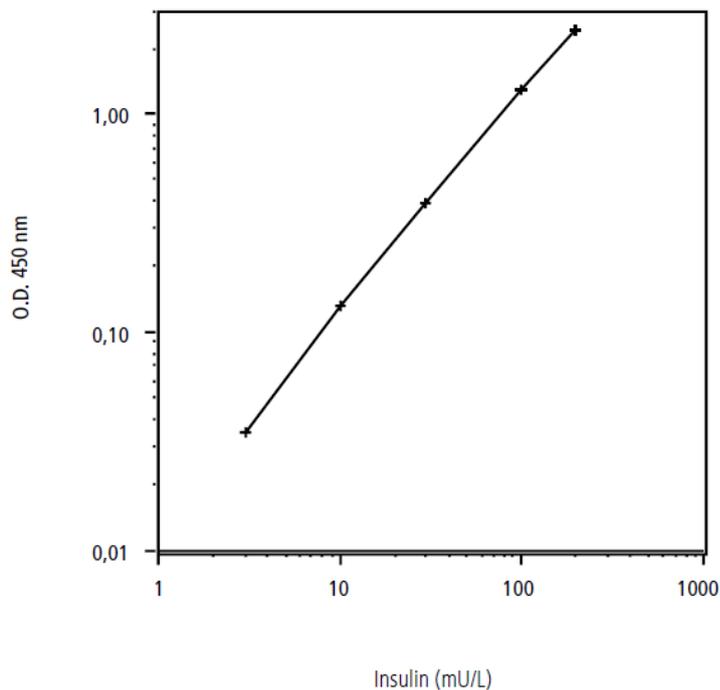
### 结果示例

孔	样本	A <sub>450nm</sub>	浓度 mU/L
1A-B	校准品 0	0.070/0.071	
2C-D	校准品 1*	0.105/0.106	
3E-F	校准品 2*	0.202/0.204	
4G-H	校准品 3*	0.434/0.470	
2A-B	校准品 4*	1.348/1.351	
2C-D	校准品 5*	2.451/2.476	
2E-F	样本 1	0.222/0.214	11.1
2 G-H	样本 2	0.546/0.538	35.6
3A-B	样本 3	1.941/1.978	153

\*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。



## 单位换算

1 $\mu$ g/L=23 mU/L; 1mU/L=6.0 pmol/L

## 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 10 mU/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

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 1mU/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 94-113% (平均值为 104%)

稀释的回收率为 101-110% (平均值 106%)

### 钩状效应

样本浓度大于 30000 mU/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	变异系数%		
		批内%	批间%	总体%
1	11	3.4	3.6	5.0
2	36	4.0	2.6	4.7
3	80	2.8	2.8	4.0
4	154	3.2	2.9	4.4

### 特异性

C-peptide	<0.01%
Proinsulin	<0.01%
Proinsulin des(31-32)	<0.5%
Proinsulin split(32-33)	<0.5%
Proinsulin des(64-65)	98%
Proinsulin split(65-66)	56%
Insulin aspart	3.2%
Insulin detemir	<0.0000007%
Insulin glargin	19%
Insulin glulisine	<0.000003%

Insulin lispro	<0.000003%
IGF- I	< 0.02%
IGF-II	< 0.02%
Rat insulin	0.7%
Mouse insulin	0.3%
Porcine insulin	374%
Ovine insulin	48%
Bovine insulin	31%

### 校准

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

### 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

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

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.

Riserus U, Vessby B, Arner P and Zethelius B (2004) Supplementation with trans10cis12-conjugated linoleic acid induces hyperproinsulinaemia in obese men: close association with impaired insulin sensitivity. *Diabetologia* 47:1016-1019.

Rudovich NN, Rochlitz HJ and Pfeiffer AF (2004) Reduced hepatic insulin extraction in response to gastric inhibitory polypeptide compensates for reduced insulin secretion in normal-weight and normal glucose tolerant first-degree relatives of type 2 diabetic patients. *Diabetes* 53:2359-2365.

Sjostrand M, Gudbjornsdottir S, Holmang A, Lonn L, Strindberg L and Lonnroth P (2002) Delayed transcapillary transport of insulin to muscle interstitial fluid in obese subjects. *Diabetes* 51:2742-2748.

## 方案概要表

### 人胰岛素 ELISA 试剂盒

加入校准品和样本	25 $\mu$ L
加入酶结合物 1 $\times$ 溶液	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	6 次
加入底物 TMB	200 $\mu$ L
温育	在 18-25 $^{\circ}$ C 下 15 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>

31-3107

Version 9.0