

**胰岛素原定量检测试剂盒（酶联免疫法）说明书 V11.0**

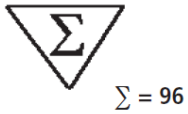




10-1118-01

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

胰岛素原定量检测试剂盒（酶联免疫法）提供了一种血清、血浆中胰岛素原的定量检测方法。

## 本试验综述和说明

胰岛素原是胰岛素前体，它的激素机理为控制糖代谢。由胰岛  $\beta$  细胞合成，进一步裂解成 C 肽和胰岛素。高浓度的胰岛素原常被早期或晚期  $\beta$  细胞胰腺肿瘤的患者所关注。患有  $\beta$  细胞肿瘤的病人的胰岛素、C 肽、胰岛素原浓度升高，其中只有胰岛素偶尔会升高。尽管胰岛素原的生物活性低，但是它的大量增加会产生低血糖。肾衰竭、肝硬化、甲亢患者的胰岛素原浓度升高也可能被检测出来。

## 检测程序的原理

Mercodia 胰岛素原检测试剂盒（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原分子的抗原决定簇上。在孵育过程中，样本中的胰岛素原与结合在微孔(板)中的酶标胰岛素原抗体和胰岛素原抗体反应。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

- 配备相应容积移液管（重复移取加入试验缓冲液、酶结合物溶液、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）
- 具有 overflow 功能的洗板机（建议不要求）

## 试剂

各 Merckodia 胰岛素原 ELISA 检测试剂盒都包含 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。

<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原		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</b>	4 瓶	1000µL	冻干粉
重组人胰岛素原			每瓶加入 1000µL 重蒸水
黄色			
浓度标示在瓶标签上，重配校准品，-20°C 储存，4 周以上。			
<b>校准品 0</b>	1 瓶	5 mL	准备好使用
黄色			
<b>试验缓冲液（红色）</b>	1 瓶	6 mL	准备好使用
<b>酶结合物 11×</b>	1 瓶	2.2mL	制备，见下文
小鼠单克隆胰岛素原抗体			
<b>酶结合物缓冲液</b>	1 瓶	22mL	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°C，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

如下表，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。1 天内使用。

条数量	酶结合物 11×	酶结合物缓冲液
12 条	1 瓶	1 瓶
8 条	350 $\mu\text{L}$	7.0 mL
4 条	200 $\mu\text{L}$	4.0 mL

## 样本的收集和处理

样本为血清或 EDTA 血浆。含有胰岛素原会使血清或 EDTA 血浆样本储存条件和反复冻融比较敏感，加入抑肽酶到 EDTA 血浆样本中，不会提高稳定性。

### 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  $-80^{\circ}\text{C}$  储存至少 24 小时。避免反复冻融。

### 血浆

#### ● EDTA 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  $2-8^{\circ}\text{C}$  下储存至 24 小时。样本应储存在  $-80^{\circ}\text{C}$ 。避免反复冻融。

## 样本的制备

通常不需稀释，但样本浓度  $>132 \text{ pmol/L}$  需要用校准品 0 以 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 50  $\mu\text{L}$  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 $\mu\text{L}$  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 ( $18-25^{\circ}\text{C}$ ) 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 Merckodia 糖尿病抗原质控试剂盒 (10-1134-01/10-1164-01) 和/或含有低、中和高浓度胰岛素原的内部血清池, 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原浓度, 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, 相对于胰岛素原浓度, 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。

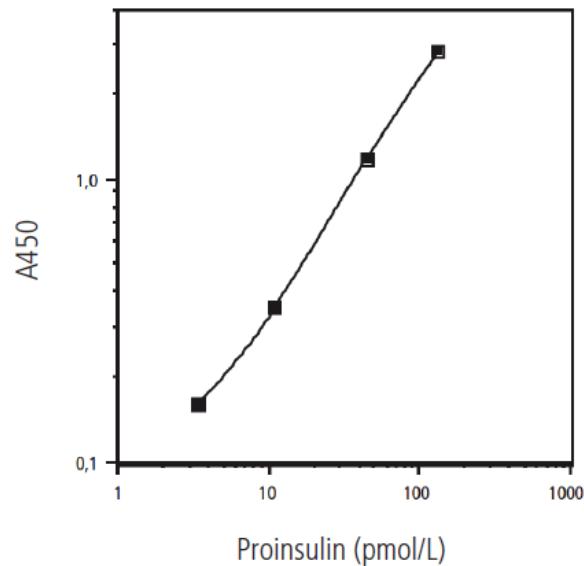
### 结果示例

孔	样本	A <sub>450nm</sub>	浓度 pmol/L
1A-B	校准品 0	0.070/0.069	
1C-D	校准品 1*	0.156/0.163	
1E-F	校准品 2*	0.347/0.354	
1G-H	校准品 3*	1.157/1.176	
2A-B	校准品 4*	2.862/2.831	
2C-D	样本 1	0.208/0.208	5.25
2E-F	样本 2	0.252/0.254	7.07
2 G-H	样本 3	0.563/0.589	19.8
3A-B	样本 4	1.592/1.571	63.2

\*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。

## 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 112 例健康空腹个体，检测值为 10 pmol/L，  
中值为 7 pmol/L 和一个范围（3.3-28 pmol/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 以上的两个标准偏差来计算，检测极限是 0.5 pmol/L。

### 回收率

加入的回收率为 97%。

### 钩状效应

样本浓度大于 80 000 pmol/L 都可检测出来，不出现假低的结果。

### 精密度

对来自 7 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	7.3	3.2	3.9	5.1
2	20.7	3.2	5.2	6.1
3	65.6	2.5	4.2	5.0

### 特异性

Insulin	<0.03%
C-peptide	<0.006%
Proinsulin Des(64-65)	84%
Proinsulin Split(65-66)	90%
Proinsulin Des(31-32)	95%
Proinsulin Split(32-33)	95%

### 校准

Mercodia 胰岛素原 ELISA 试剂盒依据人胰岛素原的国际参考试剂 IRR 84/611 校准。



## 单位换算

1µg/L =110 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

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

Garcia CA, Prabakar KR, Diez J, Cao ZA, Allende G, Zeller M, Dogra R, Mendez A, Rosenkranz E, Dahl U, Ricordi C, Hanahan D, Pugliese A (2005) Dendritic cells in human thymus and periphery display a proinsulin epitope in a transcription-dependent, capture-independent fashion. *J Immunol* 175:2111-2122

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

Yin H, Berg AK, Westman J, Hellerstrom C, Frisk G (2002) Complete nucleotide sequence of a Coxsackievirus B-4 strain capable of establishing persistent infection in human pancreatic islet cells: effects on insulin release, proinsulin synthesis, and cell morphology. *J Med Virol* 68:544-557

更多参考文献可以链接网址: [www.merckodia.com](http://www.merckodia.com)

## 方案概要表

### 胰岛素原 ELISA 试剂盒

加入校准品、质控品和样本	50 $\mu$ 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 15 分钟
加入终止溶液	50 $\mu$ L 振荡 5 秒钟以确保混匀
在 A450 下测量	评估结果

质控品未提供

所有细节见第 6 页

31-3110

Version 11.0