

## 猪胰岛素定量检测试剂盒（酶联免疫法）说明书 V3.0

即用

10-1200-01

96 人份试剂



由瑞典 Mercodia AB 制造

用于标签上的标识的说明

 $\Sigma = 96$	96 测试试剂
	失效日期
	在 2-8°C 下储存
	批号

## 预期用途

猪胰岛素定量检测试剂盒（酶联免疫法）提供了一种猪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  $\beta$  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、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。

对于 1 型糖尿病，胰岛细胞移植被认为是一种有潜力的疗法，捐赠者的紧缺和难于从成年人的胰腺中分离纯化胰岛细胞，现转移关注猪的胰腺<sup>[1-4]</sup>，猪和人类的胰岛素结构上相似，猪胰岛素的代谢机制类似于人类，参考因素诸于胰岛素的分泌曾被用于研究胰岛移植的可行性。

## 检测程序的原理

猪胰岛素检测试剂盒（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

- 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。
- 所有的样本都应按潜在传染物处理。

## 要求但未提供的材料

- 25 $\mu$ L、50 $\mu$ L、100 $\mu$ L、200 $\mu$ L、1000 $\mu$ L 移液管（重复移取加入酶结合物溶液、TMB 底物和终止溶液）
- 用于试剂制备的试管、烧杯和量筒
- 磁力搅拌器

- 涡轮混合器
- 重蒸水
- 平板振荡器（建议速率 700-900 循环/分钟，轨道运动）
- 洗板机需要 overflow 功能（建议不要求）
- 酶标仪（含 450nm 滤光片）

## 试剂 1×96

各 Mercodia 猪胰岛素 ELISA 检测试剂盒（10-1200-01）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	准备好使用
猪胰岛素			
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	1.3mL	制备，见下文
过氧化物酶结合的鼠单克隆抗体			
<b>酶结合物缓冲液</b>	1 瓶	13mL	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！			

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。轻柔混合。

当为整个平板制备酶结合物 1×溶液时或者在 2 周内完成使用，将所有酶结合物缓冲液倒入酶结合物 11×瓶中，

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	400 μL	4.0 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，样本含量大于最大浓度校准品，应使用校准品 0 或者 Mercodia 糖尿病样品缓冲液 (10-1195-01) 稀释 1/10 倍。

### 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、样本到适当的孔中。
4. 向各孔中加入 100μL 酶结合物 1×溶液。
5. 将上述微孔板放入平板振荡器（700-900rpm）在室温下（18-25℃）温育 2 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。在室温下（18-25℃）温育 15 分钟。
8. 加入 50μL 终止溶液。将平板放入振荡器 5 秒以确保混匀。
9. 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（10-1221-01）和/或含有低、中和高浓度猪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 以外的校准品的猪胰岛素浓度，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，相对于猪胰岛素浓度，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。

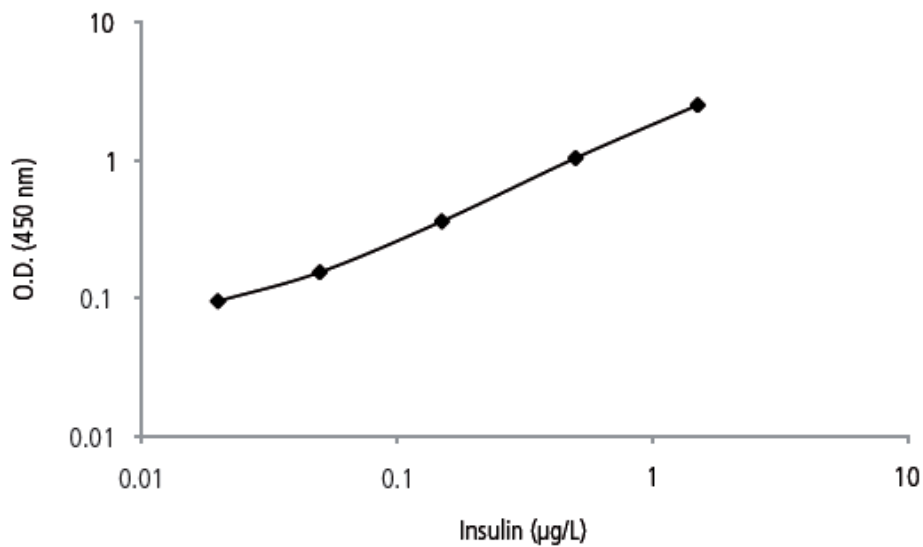
### 结果示例

孔	样本	A <sub>450nm</sub>	浓度 µg /L
1A-B	校准品 0	0.054/0.053	
1C-D	校准品 1*	0.090/0.086	
1E-F	校准品 2*	0.135/0.133	
1G-H	校准品 3*	0.319/0.329	
2A-B	校准品 4*	0.907/0.880	
2C-D	校准品 5*	2.405/2.304	
2E-F	样本 1	0.184/0.185	0.079
2 G-H	样本 2	0.571/0.560	0.290
3A-B	样本 3	1.597/1.543	0.977

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

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。

## 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。

## 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  $\leq 0.01 \mu\text{g/L}$ 。

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 100-111% (平均值为 105%)

稀释的回收率为 90-112% (平均值 97%)

### 钩状效应

样本浓度大于  $1000 \mu\text{g/L}$  都可检测出来，不出现假低的结果。

### 精密度

对来自 13 个不同地点的样本进行 4 个重复试验。

样本	平均值 $\mu\text{g/L}$	批内%	变异系数%	
			批间%	总体%
1	0.062	3.5	3.9	4.3
2	0.127	3.8	2.6	3.2
3	0.239	3.1	1.5	2.2

### 特异性

如下为已知的交叉反应：

Porcine C-peptide	<0.001%
Porcine Proinsulin	<0.2%
Human C-peptide	<0.01%
Human insulin	28%



Human proinsulin	<0.1%
Humalog	<0.0000006%
Lantus	5.4%
Levemir	<0.0000002%
NovoRapid	0.7%

### 校准

Mercodia 猪胰岛素 ELISA 试剂盒依据猪胰岛素的内部参考准备进行校正。

### 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

1. Bogdani M, Suenens K, Bock T, Pipeleers-Marichal M, In't Veld P, Pipeleers D (2005) Growth and Functional Maturation of beta-cells in Implants of Endocrine Cells Purified From Prenatal Porcine Pancreas. *Diabetes* 54:3387-3394
2. Dufrane D, D'hoore W, Goebbles RM, Saliez A, Guiot Y, Gianello P (2006) Parameters favouring successful adult pig islet isolations for xenotransplantation in pig-to-primate models. *Xenotransplantation* 13:204-214
3. Groth CG, Tibell A, Wennberg L, Bennet W, Lundgren T, Rydgård KJ, Lundin S, Lindeborg E, Korsgren O (2000) Clinical aspects and perspectives in islet xenotransplantation. *J Hepatobiliary Pancreat Surg* 7:364-369
4. Korsgren O, Jansson L, Eizirik D, Andersson A (1991) Functional and morphological differentiation of fetal porcine islet-like cell clusters after transplantation into nude mice. *Diabetologia* 34:379-386
5. Martinez-Puig D, Mourot J, Ferchaud-Roucher V, Anguita M, Garcia F, Krempf M, Pérez, JF (2006) Consumption of resistant starch decreases lipogenesis in adipose tissues but not in muscular tissues of growing pigs. *Livestock Science* 99:237-247
6. Ramsay TG, Bush JA, McMurtry JP, Thivierge MC, Davis TA (2004) Peripheral leptin administration alters hormone and metabolite levels in the young pig. *Comp Biochem Physiol* 138:17-25

## 方案概要表

### 猪胰岛素 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 2 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	估计结果

31-3158

Version 3.0