

小鼠超敏胰岛素定量检测试剂盒（酶联免疫法）说明书 V3.0

10-1249-01

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

小鼠超敏胰岛素定量检测试剂盒（酶联免疫法）提供了一种小鼠血清或血浆样本中胰岛素的定量检测方法。

检测程序的原理

小鼠超敏胰岛素检测试剂盒（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

- 不能用于人类或动物的口服或外用。
- 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

- 配备相应容积移液管（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
- 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）
- 洗板机需要 overflow 功能（建议不要求）

试剂 1×96

各 Mercodia 小鼠超敏胰岛素 ELISA 检测试剂盒（10-1249-01）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℃。

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、5	5 瓶	1000 μ L	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\times	1 瓶	1.3mL	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	13mL	准备好使用
蓝色			
洗涤缓冲液 21\times	1 瓶	50 mL	制备 1 \times 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 \times 溶液的制备

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

条数量	酶结合物 11 \times	酶结合物缓冲液
12 条	1 瓶	1 瓶
6 条	600 μ L	6.0 mL
4 条	400 μ L	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，当样品胰岛素浓度大于最高校准品 5，应使用校准品 0 稀释 1/10 倍。注意！含有叠氮钠（ NaN_3 ）的缓冲液不能用于样本稀释。

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 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。

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（10-1220-01）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

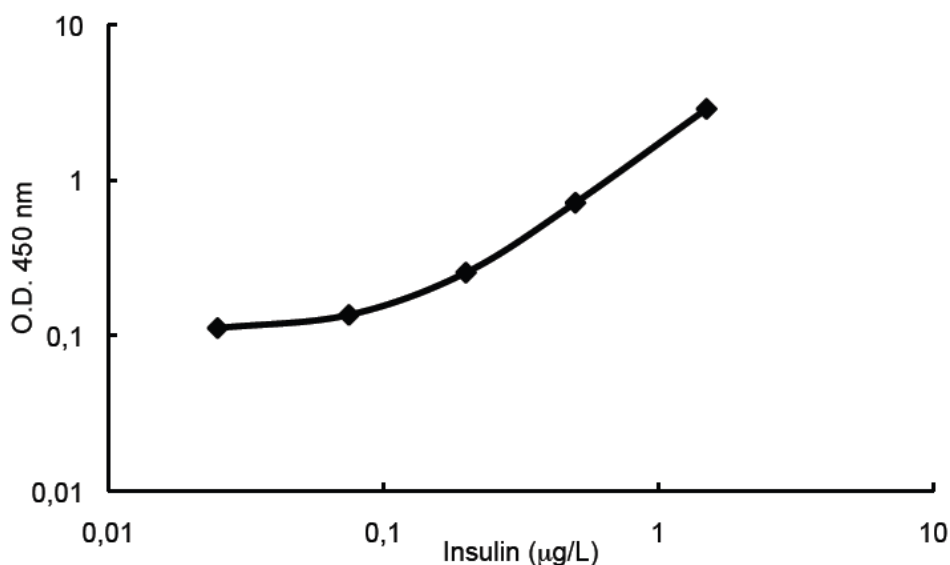
孔	样本	A _{450nm}	浓度 mU/L
1A-B	校准品 0	0.099/0.094	
1C-D	校准品 1*	0.115/0.109	
1E-F	校准品 2*	0.136/0.136	
1G-H	校准品 3*	0.248/0.261	
2A-B	校准品 4*	0.703/0.730	
2C-D	校准品 5*	2.877/2.881	

2E-F	样本 1	0.184/0.180	0.131
2 G-H	样本 2	0.248/0.260	0.200
3A-B	样本 3	0.386/0.409	0.308

*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 µg=174 pmol/L

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 $\leq 0.025 \mu\text{g/L}$ 。

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 76-94% (平均值为 85%)

稀释的回收率为 110-132% (平均值 123%)

钩状效应

样本浓度大于 450 $\mu\text{g/L}$ 都可检测出来，不出现假低的结果。

精密度

对来自 16 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	0.14	2.9	4.9	5.1
2	0.22	1.5	3.9	5.1
3	0.26	2.2	4.5	4.6

特异性

Human insulin	195%
Human proinsulin	82%
Human C-peptide	<0.05%
IGF- I	< 0.02%
IGF-II	< 0.02%
Rat insulin	146%
Rat proinsulin	14%
Rat C-peptide	<0.001%
Porcine insulin	628%
Ovine insulin	256%
Bovine insulin	110%

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，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

Blyszczuk P, Czyz J, Kania G, Wagner M, Roll U, St-Onge L and Wobus AM (2003) Expression of Pax4 in embryonic stem cells promotes differentiation of nestin-positive progenitor and insulin-producing cells. *Proc Natl Acad Sci U S A* 100:998-1003.

Burcelin R, Crivelli V, Perrin C, Da Costa A, Mu J, Kahn BB, Birnbaum MJ, Kahn CR, Vollenweider P and Thorens B (2003) GLUT4, AMP kinase, but not the insulin receptor, are required for hepatportal glucose sensor-stimulated muscle glucose utilization. *J Clin Invest* 111:1555-1562.

Friesen NT, Buchau AS, Schott-Ohly P, Lgssiar A and Gleichmann H (2004) Generation of hydrogen peroxide and failure of antioxidative responses in pancreatic islets of male C57BL/6 mice are associated with diabetes induced by multiple low doses of streptozotocin. *Diabetologia* 47:676-685.

Jaeckel E, Lipes MA and von Boehmer H (2004) Recessive tolerance to preproinsulin 2 reduces but does not abolish type 1 diabetes. *Nat Immunol* 5:1028-1035.

更多参考文献可链接网址: www.mercoDia.com

方案概要表

小鼠胰岛素 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 溶液	100 μ 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, 每次 700 μ L
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	估计结果

质控品未提供

所有细节参见第 6 页

31-3176

Version 3.0