

产品信息

产品名称	产品编号	规格
Human Insulin ELISA Kit	ABC0037-48T	48T
	ABC0037-96T	96T

产品简介

胰岛素（Insulin，INS）是由胰岛β细胞分泌的一种蛋白质，由A、B两条肽链通过二硫键连接而成，是一种蛋白质激素。胰脏内的胰岛β细胞受内源性或外源性物质如葡萄糖、乳糖、核糖、精氨酸、胰高血糖素等的刺激而分泌，能促进脂肪、肝脏和骨骼肌细胞吸收血液中的葡萄糖，从而对糖类、脂肪和蛋白质代谢起重要作用。胰岛素是机体内唯一降低血糖的激素，也是唯一同时促进糖原、脂肪、蛋白质合成的激素，是协调各组织能量利用的最重要激素。主要作用在肝脏、肌肉及脂肪组织，控制着蛋白质、糖、脂肪三大营养物质的代谢和贮存。临床上常采用葡萄糖耐量实验(OGTT)结合胰岛素释放实验来了解胰岛β细胞的功能。

Human Insulin ELISA Kit 通过双抗体夹心酶联免疫吸附技术，体外定量检测人血清、血浆、细胞培养上清或其它相关液体中的胰岛素，可同时检测天然的和重组的人胰岛素。

储存与运输

冰袋运输；4℃保存，有效期 12 个月；开封后需在 4 周内用完。

需准备的材料设备

1. 能够检测 450 nm 吸光度的酶标仪，参考波长 630 nm（建议参考仪器使用说明提前预热）；
2. 单道或多道移液器及吸头，加样槽，离心管；
3. 蒸馏水或去离子水；
4. 干性滤纸或吸水纸；
5. 涡旋混匀仪，微孔板振荡器。

样本的采集与保存

- 1. 血清样本：**采集血样，静置 30 分钟，血液凝固。取液体部分进行离心分离，1000 g 离心 15 分钟，吸取上清即可检测，或者分装，分装上清置于-20℃以下保存，避免反复冻融。
- 2. 血浆：**用 EDTA、枸橼酸钠或肝素作为抗凝剂收集血浆样本，并将样本在采集后的 30 分钟内于 2-8℃ 1000 g 离心 15 分钟，吸取上清即可检测，或者分装，分装上清置于-20℃以下保存，避免反复冻融。
- 3. 细胞培养上清：**300 g 离心 10 分钟，吸取上清即可检测，或者分装，分装上清置于-20℃以下保存，避免反复冻融。

注意：

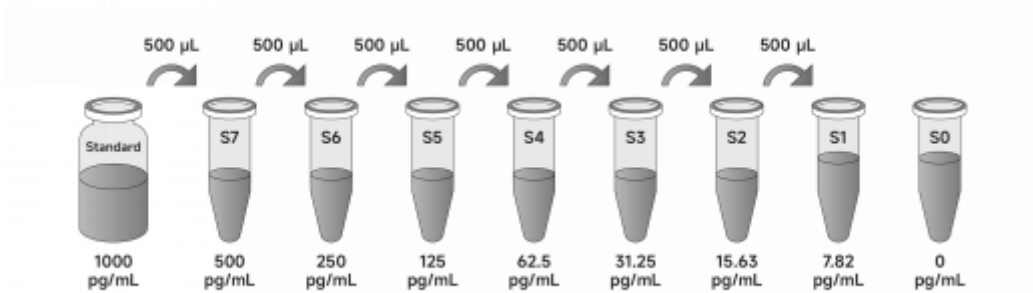
1. 样本如果浑浊，必须离心去除沉淀物，不适用严重溶血或高血脂的样本。
2. 以上样本均需密封保存，4℃保存不超过 1 周，-20℃保存不超过 1 个月，-80℃保存不超过 2 个月。
3. 冷冻样本使用前应缓慢平衡至室温。

试剂的配制

1. 提前 20 分钟将试剂盒及样本从冰箱中取出，平衡至室温。按实验需求取出本次实验所需板条和试剂，每次检测后剩余试剂请及时置于 4℃保存。
2. 1×洗液配制：取 25×浓缩洗液 30 mL 至 1 L 的量筒，加蒸馏水或去离子水至 750 mL，轻轻混匀。转移至干净瓶内。
3. 标准品配制：将稀释液 A 按照标签标注体积加入标准品中，轻柔涡旋振荡，确保充分混匀。重溶后的标准品浓度为 1000 pg/mL，即为浓缩的人 INS 标准品。重溶后静置 10 分钟，稀释前充分混匀。
 - a) 血清/血浆样本标准曲线制备：

充分混匀重溶后的标准品，取 500 μL 浓缩的人 Insulin 标准品，加入 500 μL 稀释液 A，作为标准曲线的最高浓度 S7 (500 pg/mL)。取 6 个 1.5 mL 离心管 (S1-S6) 依次排列，各加入 500 μL 稀释液 A。吸取 500 μL S7 (500 pg/mL) 标准品到第一个离心管 S6 中，轻轻吹打混匀。从 S6 中吸取 500 μL 到第二个离心管 S5 中，轻轻吹打混匀。以此类推进行标准品的倍比稀释。S0 为稀释液 A。
 - b) 细胞培养上清样本标准曲线制备：

充分混匀重溶后的标准品，取 500 μL 浓缩的人 Insulin 标准品，加入 500 μL 细胞培养基，作为标准曲线的最高浓度 S7（500 pg/mL ）。取 6 个 1.5 mL 离心管（S1-S6）依次排列，各加入 500 μL 细胞培养基。吸取 500 μL S7（500 pg/mL ）标准品到第一个离心管 S6 中，轻轻吹打混匀。从 S6 中吸取 500 μL 到第二个离心管 S5 中，轻轻吹打混匀。以此类推进行标准品的倍比稀释。S0 为细胞培养基。



4. 1 \times 检测抗体配制：检测抗体短暂离心，用稀释液 B 按照 1:100 倍稀释至工作浓度。混匀制成 1 \times 检测抗体工作液，临用前配制。

5. 1 \times SA-HRP 配制：SA-HRP 短暂离心，用稀释液 B 按照 1:100 倍稀释至工作浓度。混匀制成 1 \times SA-HRP 工作液，临用前配制。

注意：

1. 未开封的试剂盒：未拆封的试剂盒可整盒保存于 4 $^{\circ}\text{C}$ ，有效期 12 个月。
2. 已开封的试剂盒：有效期 4 周，冻干标准品溶解后不能再次使用，剩余试剂及时放置 4 $^{\circ}\text{C}$ 保存。此外，请将未使用的板条用包含干燥剂的铝箔袋装好，并拉紧密封铝箔袋，置于 4 $^{\circ}\text{C}$ 保存。

操作步骤

1. 加样：分别设标准孔、待测样本孔、空白孔。用稀释液 A 稀释标准品及样本，设标准孔 7 孔（S1-S7），每孔依次加入 100 μL 不同浓度的标准品，空白孔每孔加入 100 μL 稀释液 A，余孔每孔加入待测样品 100 μL ，封板膜封板，100-300 rpm 振荡（保证每孔溶液不洒出且能充分混匀即可），室温振荡孵育 2 小时；

注意：请先查阅相关文献确定样本中待检测蛋白的大致浓度，如果该浓度大于或者小于本试剂盒的最高或者最低标准品浓度，请进行适当稀释或浓缩后再检测。

2. **洗板：**自动洗板机或手工洗板，每孔洗涤液为 300 μL ，注入与吸出间隔 15-30 秒。洗板 5 次。最后一次洗板完成后将酶标板倒扣在吸水纸上适当用力拍干，弃去孔内液体；
3. **加检测抗体：**用稀释液 B 将检测抗体稀释至工作浓度，每孔加 1 \times 检测抗体工作液 100 μL （临用前配制），更换新的封板膜封板，100-300 rpm 振荡（保证每孔溶液不洒出且能充分混匀即可），室温振荡孵育 1 小时；
4. **洗板：**重复步骤 2；
5. **加 SA-HRP：**用稀释液 B 将 SA-HRP 稀释至工作浓度，每孔加 1 \times SA-HRP 工作液（临用前配制）100 μL ，更换新的封板膜封板，100-300 rpm 振荡（保证每孔溶液不洒出且能充分混匀即可），室温振荡孵育 30 分钟；
6. **洗板：**重复步骤 2；
7. **加显色液 TMB：**每孔加 TMB 底物溶液 90 μL ，更换新的封板膜，室温避光显色（反应时间应控制在 10-30 分钟，不要超过 30 分钟。当标准品的前 3-4 孔有明显的梯度蓝色，后 3-4 孔梯度不明显时，即可终止）；
8. **加终止液：**每孔加终止溶液 50 μL ，终止反应，此时蓝色立转黄色。终止液的加入顺序应尽量与底物溶液的加入顺序相同。如出现颜色不均一情况，请轻轻晃动酶标板以使溶液混合均匀；
9. **读数：**在确保酶标板底部无水滴及孔内无气泡后，10 分钟内用检测波长 450 nm 读值。推荐用双波长即检测波长 450 nm、参考波长或校正波长 630 nm 同时读值，仅使用 450 nm 读值会降低准确度。

注意事项

1. 试剂盒按说明书保存，使用前室温平衡 20-30 分钟。
2. 标准品为冻干粉，所需加入的稀释液体积及稀释倍数，请严格按照试剂盒说明书进行操作。为保证标准品的精确性，标准品配制使用后，如果有剩余请勿再次使用。
3. 25 \times 洗液在低温下可能有结晶，如果发现结晶，请 37 $^{\circ}\text{C}$ 温育使结晶完全溶解后再配制成工作液。
4. TMB 对人体有刺激性，操作时请注意适当防护，避免试剂直接接触皮肤和眼睛。如不慎接触，请立即用大量清水清洗。
5. 试剂盒中的终止液为酸性溶液，操作时请注意适当防护，避免试剂直接接触皮肤和眼睛。如不慎接触，请立即用大量清水清洗。
6. 如果发现显色液 TMB 出现混浊或颜色变成蓝色，请立即停止使用。
7. 不宜混用不同批号的试剂盒组份，每批次试剂盒均经过独立测试，不能混用。

8. 本试剂盒的操作在室温进行, 要求严格控制室温在 25-28°C。温度低于 25°C 会导致最终检测到的吸光度显著下降。
9. 检测标准品和样品时建议设置重复孔, 以确保检测结果的可信度。
10. 在试剂盒的贮存或孵育过程中请避免强光照射。
11. 加样过程中需避免气泡的产生。
12. 在操作试剂盒或处理样本时请穿实验服, 佩戴乳胶或一次性手套。
13. 本产品仅限于专业人员的科学研究用, 不得用于临床诊断或治疗, 不得用于食品或药品, 不得存放于普通住宅。
14. 为了避免微生物的污染及试剂与样本间的交叉污染, 加样时请注意每个样品或标准品必须更换枪头。
15. 洗涤过程中反应孔中残留的洗涤液应在滤纸上充分拍干, 滤纸上看不到水印。勿将滤纸直接放入反应孔中吸水。

结果分析

1. 结果计算

为了获得更准确的实验结果, 建议标准品及样本进行复孔检测。计算标准品和样本的平均 OD 值, 然后减去空白孔的 OD 值。

以标准品浓度为横坐标, OD 值为纵坐标, 用计算机软件进行回归拟合生成标准曲线, 相关系数 R 值越接近 1, 拟合效果越好。回归分析确定最佳拟合曲线。

代入样本检测 OD 值, 计算出样本浓度, 若样本进行了稀释, 应乘以稀释倍数, 即为样本的实际浓度。

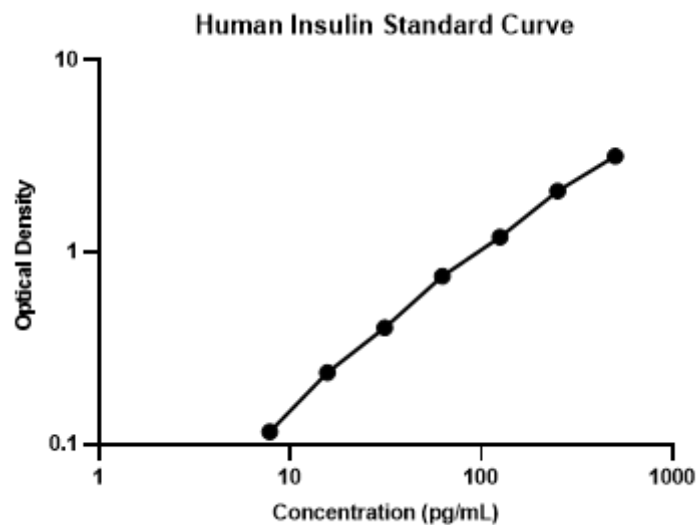
通过对浓度值和 OD 值取对数拟合, 可以对标准曲线进行线性化。此过程可能可以得到更多样本的浓度, 但数据的准确度会降低。

pg/mL	OD		Average	Corrected
500	3.106	3.297	3.202	3.159
250	2.067	2.179	2.123	2.080
125	1.208	1.271	1.240	1.197

62.5	0.759	0.823	0.791	0.748
31.25	0.429	0.463	0.446	0.403
15.63	0.262	0.296	0.279	0.236
7.82	0.138	0.179	0.159	0.116
0	0.034	0.052	0.043	

2. 典型数据

每次检测每块酶标板都必须设立单独的标准曲线。由于实验操作条件的不同(如操作者、洗板条件和温度条件等)，每次实验标准曲线的 OD 值会有所差异。说明书提供的标准曲线仅供参考。



检测步骤概要

1. 实验前按说明书准备标准品、试剂及样本；
2. 加样（标准品或样本）100 μ L/孔，室温振荡 2 小时；
3. 洗涤 5 次后拍干，加检测抗体工作液 100 μ L/孔，室温振荡 1 小时；



Human Insulin ELISA Kit

目录号 : ABC0037-96T

4. 洗涤 5 次后拍干，加 SA-HRP 工作液 100 μ L/孔，室温振荡 30 分钟；
5. 洗涤 5 次后拍干，加 TMB 底物 90 μ L/孔，室温避光孵育 10—30 分钟；
6. 加终止液 50 μ L/孔；
7. 10 分钟内于 450 nm 波长处检测 OD 值，参考波长 630 nm。