

小鼠Insulin双抗夹心ELISA检测试剂盒

请在实验前仔细阅读本说明书

产品货号: KE10089
规格: 96T
灵敏度: 1.3 pg/mL
检测范围: 6.25 - 400 pg/mL
用途: 此试剂盒用于定量检测血清和血浆中的小鼠Insulin浓度

本产品仅用于科学研究，不适用于临床诊断

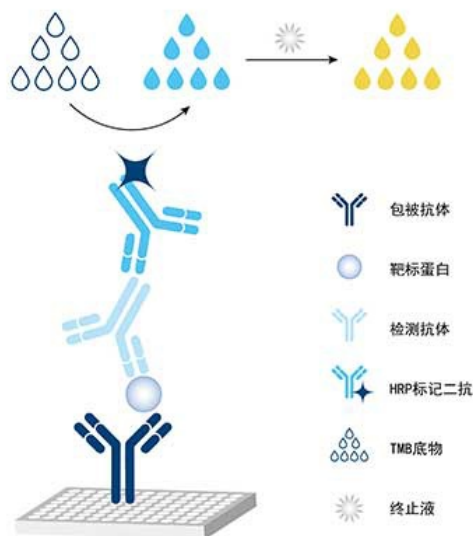
目录

| | |
|------------|---|
| 一：背景信息 | 3 |
| 二：检测原理 | 3 |
| 三：需自备的实验器材 | 3 |
| 四：试剂盒组分及储存 | 4 |
| 五：实验注意事项 | 4 |
| 六：样本准备 | 4 |
| 七：试剂准备 | 5 |
| 八：实验步骤 | 6 |
| 九：实验参数 | 7 |
| 9.1 参考标曲图 | 7 |
| 9.2 精密度 | 7 |
| 9.3 加标回收率 | 7 |
| 9.4 样本值 | 7 |
| 9.5 灵敏度 | 8 |
| 9.6 线性 | 8 |
| 9.7 特异性 | 8 |
| 十：参考文献 | 8 |

一：背景信息

胰岛素(Insulin)是一种肽类激素，属于Insulin-like蛋白家族，该家族还包括胰岛素样生长因子(IGFs)、松弛肽和其他Insulin-like多肽。胰岛素主要由胰岛B细胞产生，主要调控葡萄糖代谢，维持能量平衡。胰岛素由两条氨基酸肽链组成，A链有21个氨基酸，B链有30个氨基酸。A-B链之间有两处二硫键相连。胰岛素分泌异常会导致糖尿病的发生。

二：检测原理



◀双抗夹心模式图 (检测抗体不标记)

按操作顺序形成抗体夹心结构后，加入TMB底物，板孔液体由无色变成蓝色，再加入终止液液体变为黄色后进行吸光度值测定。

三：需自备的实验器材

- 3.1 酶标仪 (可读取450 nm和630 nm双波长);
- 3.2 高精度移液器及一次性移液器枪头;
- 3.3 洗板机 (亦可手动洗板);
- 3.4 EP管 (用于稀释标准品及样本);
- 3.5 吸水毛巾或滤纸 (用于拍干);
- 3.6 烧杯和量筒;
- 3.7 用于ELISA实验的数据分析的统计拟合软件 (推荐四参数拟合方法), 如: Origin, ELISA Calc等。

四：试剂盒组分及储存

| 英文名称 | 中文名称 | 规格 | 数量 |
|--|----------------------|----------|-----|
| Microplate | 预包被酶标板 - 96 孔板 | 8孔 X 12条 | 1 块 |
| Protein standard | 标准品 - 冻干粉状 * | 800 pg/瓶 | 2 瓶 |
| Detection antibody (100×) | 检测抗体浓缩液 (100×) ** | 120 μL/支 | 1 支 |
| HRP-conjugated antibody (100×) | HRP标记二抗浓缩液 (100×) ** | 120 μL/支 | 1 支 |
| Sample Diluent PT 4 | 样本稀释液 PT 4 | 30 mL/瓶 | 2 瓶 |
| Detection Diluent | 抗体稀释液 | 30 mL/瓶 | 1 瓶 |
| Wash Buffer Concentrate (20×) | 浓缩洗涤液 (20×) | 30 mL/瓶 | 1 瓶 |
| Tetramethylbenzidine Substrate (TMB) | 显色底物 TMB | 12 mL/瓶 | 1 瓶 |
| Stop Solution | 终止液 | 12 mL/瓶 | 1 瓶 |
| Plate Cover Seals | 封板膜 | | 4 张 |
| 储存条件： 1：未开启试剂盒可在2-8℃条件下存放6个月或者在-20℃条件下存放1年 2：已开启试剂盒可在2-8℃存放7天 3：每次实验均使用新的标准品,使用后丢弃 | | | |

* 使用对应的样本稀释液对标准品进行复溶，复溶过程避免产生气泡

** 开盖前请离心

五：实验注意事项

- 5.1 避免皮肤接触终止液以及TMB 显色液；
- 5.2 在实验过程中，注意穿戴个人防护装备，如实验服，手套，口罩和护目镜；
- 5.3 请勿将不同批次的试剂进行混用，过期产品请勿使用；
- 5.4 在使用自动洗板机时，板孔加入洗涤液之后，设置30秒的浸泡程序，以提高分析的精确度。

六：样本准备

- 6.1 血清：全血标本室温凝固 30 min后1000×g 离心15 min，取上清立即使用或分装后-20℃存放，避免反复冻融。
- 6.2 血浆：可用EDTA、肝素或柠檬酸盐作为抗凝剂，标本采集后1000×g 离心15 min，立即使用或分装后-20℃存放，避免反复冻融
(注意：标本溶血会影响检测结果，因此溶血标本不宜进行检测)。

七：试剂准备

7.1 洗涤液 (1×)：

如果洗涤液 (20×) 有晶体析出, 37°C加热至晶体全部溶解。按1:20稀释倍数进行稀释: 如取30 mL 浓缩洗涤液 (20×), 加入570 mL 超纯水或去离子水, 得到洗涤液 (1×)。

7.2 检测抗体 (1×)：

开盖前瞬时离心, 按1:100比例进行稀释, 稀释前根据预先计算实验所需的总量配制 (100 μL/孔), 实际配制时应多配制0.1-0.2 mL。如10 μL 检测抗体浓缩液 (100×) 加 990 μL 抗体稀释液进行配制, 轻轻混匀。

7.3 HRP标记二抗 (1×)：

开盖前瞬时离心, 按1:100比例进行稀释, 稀释前根据预先计算实验所需的总量配制 (100 μL/孔), 实际配制时应多配制0.1-0.2 mL。如10 μL HRP标记二抗浓缩液 (100×) 加 990 μL 抗体稀释液进行配制, 轻轻混匀。

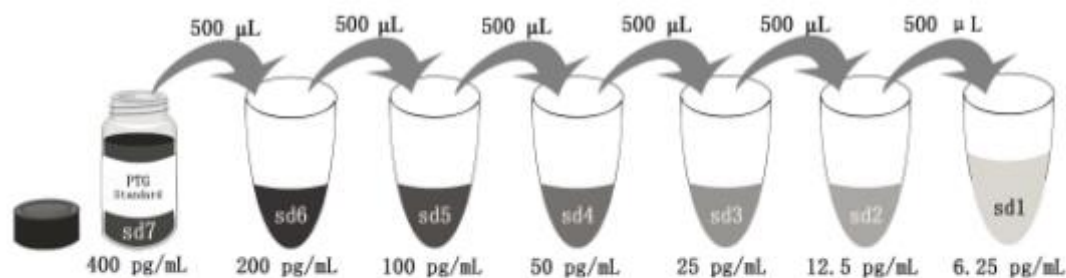
7.4 待检测样本：

如果样本检测值超过标曲最高范围, 可将样本进行一定的稀释后再进行实验, 使样本的检测值处于标曲范围内, 不同样本的稀释倍数需自行优化。

稀释比推荐如下: 小鼠血清和血浆样本1:64或1:128稀释; 样品采集、处理和储存的差异可能导致测值的改变。

7.5 梯度稀释的标准品：

使用2 mL PT 4 样本稀释液复溶标准品, 具体操作如下:



| | | | | | | | |
|---|---------|--------|--------|--------|--------|--------|--------|
| Add # μL of Standard diluted in the previous step | — | 500 μL | 500 μL | 500 μL | 500 μL | 500 μL | 500 μL |
| # μL of Sample Diluent PT 4 | 2000 μL | 500 μL | 500 μL | 500 μL | 500 μL | 500 μL | 500 μL |
| | "sd7" | "sd6" | "sd5" | "sd4" | "sd3" | "sd2" | "sd1" |

八：实验步骤

实验前,需要将所需试剂在室温平衡20-30 min(检测抗体浓缩液、 HRP标记二抗浓缩液不需要平衡室温,即用即取) ;

在进行标准品、样本以及不同试剂加样时,更换枪头,避免接触微孔板的内表面,不同的试剂,使用不同的加样槽;

8.1 根据实验用量,取出需要用到的酶标板条,剩余板条加入干燥剂放入铝箔袋密封后存放于4°C,并于一周之内用完;

8.2 加样,分别设零孔、标准孔、待测样本孔。零孔加样本稀释液100 μL,余孔分别加梯度稀释的标准品或待测样本100 μL/孔,注意不要产生气泡(建议标准品和样本都做复孔,尽量避免实验误差,确保上样不间断,5-10 min完成加样) ;

8.3 酶标板盖上覆膜,37°C孵育2 h;

8.4 洗涤

1) 揭开封板膜(动作轻柔,避免动作过大导致液体溢出串孔),弃液体,拍干;

2) 洗涤液(1×)洗涤板条,每孔350-400 μL,洗涤后,甩掉液体拍干板条,重复此步骤4次,避免异物进入板孔以及板条干燥;

8.5 每孔加100 μL 检测抗体(1×)(参照试剂准备部分7.2),盖上封板膜,37°C孵育1 h;

8.6 重复步骤8.4;

8.7 每孔加 100 μL HRP标记二抗(1×)(参照试剂准备部分7.3),盖上封板膜,37°C孵育40 min;

8.8 重复步骤8.4;

8.9 显色:每孔加TMB显色液100 μL,37°C避光显色 15-20 min(如果颜色偏浅,可适当延长显色时间,不超过30 min;保持显色底物始终处于避光状态,显色底物在加样前应是无色透明,如有变色,请勿使用) ;

8.10 终止:每孔加终止液100 μL,蓝色变黄色。终止液与TMB显色液的加样顺序一致;(注意:眼睛和皮肤避免接触终止液)

8.11 读数:以630 nm为校正波长,用酶标仪在450 nm波长测量各孔的光密度(OD值)。加入终止液后5 min内进行读数,若无630 nm 波长,也可直接使用450 nm 波长读数;

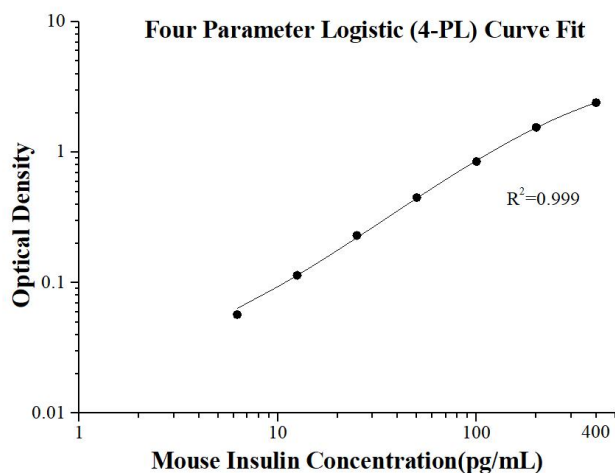
8.12 数据分析:每个标准品和样本的OD值需减去零孔的OD值,设置复孔,取其平均值。以标准品的浓度为横坐标,OD 值为纵坐标,使用专业软件(如Origin、ELISACalc等)进行四参数拟合(4-PL),根据样本的OD值由标准曲线推算出拟合浓度,乘以稀释倍数得到样本的实测浓度。

操作流程如下:

| 步骤 | 试剂 | 体积 | 孵育时间 | 洗涤次数 | 孵育温度 |
|----|--|--------|----------|-------|--------------|
| 1 | 标准品或样本 | 100 μL | 120 分钟 | 4 次 | 覆膜后37°C孵育 |
| 2 | 检测抗体(1×) | 100 μL | 60 分钟 | 4 次 | 覆膜后37°C孵育 |
| 3 | HRP标记二抗(1×) | 100 μL | 40 分钟 | 4 次 | 覆膜后37°C孵育 |
| 4 | 显色 TMB | 100 μL | 15-20 分钟 | 不需要洗涤 | 覆膜后37°C孵育,避光 |
| 5 | 终止液 | 100 μL | 0 分钟 | 不需要洗涤 | - |
| 6 | 加入终止液后以630 nm为校正波长,在450 nm处测量OD值,此过程建议不超过5分钟 | | | | |

九：实验参数

9.1 参考标曲图



| (pg/mL) | O.D | Average | Corrected |
|---------|----------------|---------|-----------|
| 0 | 0.037 0.040 | 0.039 | - |
| 6.25 | 0.093 0.098 | 0.096 | 0.057 |
| 12.5 | 0.152 0.156 | 0.154 | 0.114 |
| 25 | 0.266 0.276 | 0.271 | 0.231 |
| 50 | 0.486 0.493 | 0.490 | 0.450 |
| 100 | 0.891 0.888 | 0.890 | 0.850 |
| 200 | 1.585 1.603 | 1.594 | 1.554 |
| 400 | 2.460 2.428 | 2.444 | 2.404 |

9.2 精密度

板内精密度：3个不同浓度的样本在板内重复测定 20次；

板间精密度：3个不同浓度的样本在板间重复测定 24次。

| 板内精密度 (CV内) | | | | |
|-------------|----|-------------|-----|---------|
| 样本 | 数量 | 平均值 (pg/mL) | 标准差 | 变异系数CV% |
| 1 | 20 | 202.7 | 8.0 | 4.0 |
| 2 | 20 | 48.8 | 2.0 | 4.1 |
| 3 | 20 | 11.8 | 0.9 | 7.4 |

| 板间精密度 (CV 间) | | | | |
|--------------|----|-------------|------|---------|
| 样本 | 数量 | 平均值 (pg/mL) | 标准差 | 变异系数CV% |
| 1 | 24 | 197.2 | 13.2 | 6.7 |
| 2 | 24 | 48.7 | 2.1 | 4.4 |
| 3 | 24 | 12.6 | 0.9 | 7.3 |

9.3 加标回收率

样本稀释后，在标曲范围内选择高、中、低3个浓度，进行小鼠Insulin的加标回收率实验，结果如下：

| 样本类型 | 稀释倍数 | 均值 (%) | 范围 (%) |
|------|--------|--------|--------|
| 小鼠血清 | 1:512 | 93 | 81-103 |
| | 1:1024 | 93 | 77-106 |

9.4 样本值

应用本试剂盒，检测来自小鼠血清中小鼠Insulin的浓度：

| 样本类型 | 均值 (ng/mL) | 范围(ng/mL) |
|-------------|------------|-----------|
| 小鼠血清 (n=16) | 9.0 | 3.0-19.0 |

9.5 灵敏度

用20个重复的零孔平均OD值加上两倍标准差得到的OD值带入标准曲线拟合出对应的浓度值，此试剂盒中小鼠Insulin的灵敏度为1.3 pg/mL。

9.6 线性

用对应样本稀释液稀释样本，使稀释后的检测值处于标曲范围内，线性数据如下：

(小鼠血清样本预先稀释32倍)

| 稀释倍数 | | 小鼠血清 |
|------|--------|--------|
| 1:2 | 均值 (%) | 100 |
| | 范围 (%) | - |
| 1:4 | 均值 (%) | 101 |
| | 范围 (%) | 85-111 |
| 1:8 | 均值 (%) | 97 |
| | 范围 (%) | 81-104 |
| 1:16 | 均值 (%) | 102 |
| | 范围 (%) | 89-115 |

9.7 特异性

本试剂盒特异性识别天然和重组小鼠Insulin，加入50 ng/mL以下细胞因子，无明显交叉反应

Human:

Mouse:

Insulin

Insulin C-Peptide

十：参考文献

1. Straub SG. et al. (2002). Diabetes Metab Res Rev. 18: 451-63.
2. Heath WF. et al. (1992). J Biol Chem. 267: 419-25.
3. Concannon, P. et al. (1998). Nat. Genet. 19: 292-296.