人胰岛素定量分析酶联免疫检测试剂盒 货号：EKH121-P

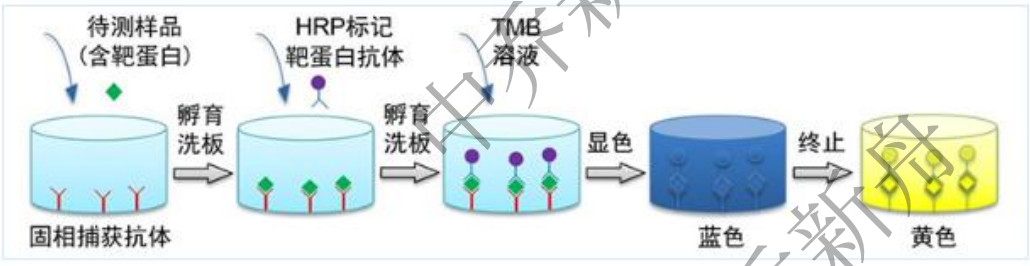
本试剂盒仅供科研使用。用于体外定量检测人血清、血浆或细胞培养上清液中的胰岛素浓度。**使用前请仔细阅读说明书并检查试剂组分是否完整。**如有产品包装破损或质量投诉，请在收到货一个月之内联系我们。如有其它疑问请登录中乔新舟公司网站或致电本公司。

1.胰岛素简介：

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。Insulin分泌异常会导致糖尿病的发生，糖尿病主要分为两类：一型糖尿病(T1D，胰岛素依赖)和二型糖尿病(T2D，胰岛素非依赖性)。T1D主要是由于胰岛B细胞无法正常分泌胰岛素所导致，而T2D则是由于胰岛素抵抗所引起。糖尿病的并发症主要包括心脏病、中风、高血压、失明、肾脏疾病和神经病。在美国，糖尿病已成为了第七大致死疾病。

2.检测原理：

本试剂盒采用双抗体夹心ELISA法检测样本中胰岛素的浓度。胰岛素捕获抗体已预包被于酶标板上，当同时加入标本或参考品和HRP偶联的抗人胰岛素抗体时，其中胰岛素的不同位点会与捕获抗体和HRP偶联的抗人胰岛素抗体结合，形成夹心复合物，锚定在固相载体板上，其它游离的成分通过洗涤的过程被除去。最后加入显色剂，若样本中存在胰岛素将会形成免疫复合物，辣根过氧化物酶会催化无色的显色剂氧化成蓝色物质，在加入终止液后呈黄色（可参考下图）。通过酶标仪检测，读其450nm处的OD值，胰岛素浓度与OD450值之间呈正比，通过参考品绘制标准曲线，对照未知样本中OD值，即可算出标本中胰岛素浓度。



双抗体夹心ELISA原理图

3.试剂盒组成

人胰岛素定量分析酶联免疫检测试剂盒组成:

组分	规格（96T）
人胰岛素预包被板	12条
标准品稀释液	10ml

人胰岛素标准品	2-4支 (冻干)*
HRP连接的抗体结合物	10ml
浓缩洗涤液 20×	30ml
TMB底物	10ml
终止液	5ml
封板胶纸	3张
说明书	1份

保存条件：

除标准品外，4℃保存6个月内有效。标准品4℃保存，1-2周内有效，-20℃保存6个月内有效。

4、检测中需要但没有提供而需要自备的材料：

不同规格的加样枪及相应的枪头；酶标仪；自动洗板机；去离子水或双蒸水.

标本收集:

1.标本的收集请按下列流程进行操作；

A.细胞上清标本离心去除悬浮物后即可；

B.血清标本应是自然凝固后，取上清，避免在冰箱中凝固血液；

C.血浆标本，推荐用EDTA的方法收集若待测样本不能及时检测，

D.标本收集后请分装，冻存于－20℃，避免反复冻融。

2.血清标本不应添加任何防腐剂或抗凝剂；

3.标本应清澈透明，检测前样本中如有悬浮物应通过离心去除。

4.请勿使用溶血，高血脂或污染的标本检测，否则结果将不准确。

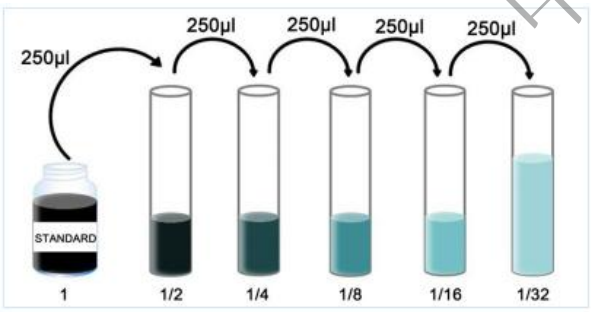
5、检测前准备工作:

1.试剂盒自冰箱中取出后应置室温（25～28℃）平衡20分钟；每次检测后剩余试剂请及时于2～8℃保存。

2.将浓缩洗涤液用双蒸水或去离子水稀释(1份加19份水)。

3.如有5x标准品稀释液，请按所需量用双蒸水或去离子水稀释(1份加4水)。

4.标准品: 按标签复溶体积加入标准品稀释液复溶使胰岛素终浓度达到200 mIU/L，室温反应，请严格控制在25～28℃，静置10~15分钟后轻轻混匀（建议抽吸几次）待彻底溶解，用标准品稀释液倍比梯度稀释后依次加入检测孔中。（标准曲线取七个点，最高浓度为200 mIU/L,标准品稀释液直接加入作为0浓度.）



标准品倍比稀释示意图。按标准品(STANDARD)标签上标注体积加入标准品稀释液溶解并混匀后的浓度为标准品的起始浓度。其它的倍比稀释后的浓度依次为起始浓度的1/2、1/4、1/8、1/16和1/32。

洗涤方法:

自动洗板机或人工洗板：每孔洗涤液为300ul，注入与吸出间隔15-30秒。最后一次洗板完成后将板倒扣着在厚吸水纸上用力拍干。

6、操作步骤:

1.通过计算并确定一次性实验所需的板条数，取出所需板条放置在框架内，暂时用不到板条请放回铝箔袋密封，保存于4℃。

2.建议设置本底较正孔，即空白孔,设置方法为该孔只加TMB显色液和中止液。每次实验均需做标准品对照并画出标准曲线。

3.分别将标本或不同浓度标准品(25ul/孔)加入相应孔中，快速加入HRP连接抗体工作液(100ul/孔)。用封板胶纸封住反应孔，室温（25～28℃）孵育120分钟。

4.洗板5次，且最后一次置厚吸水纸上拍干。

5.加入显色剂TMB100ul/孔，避光室温（25～28℃）孵育10分钟。

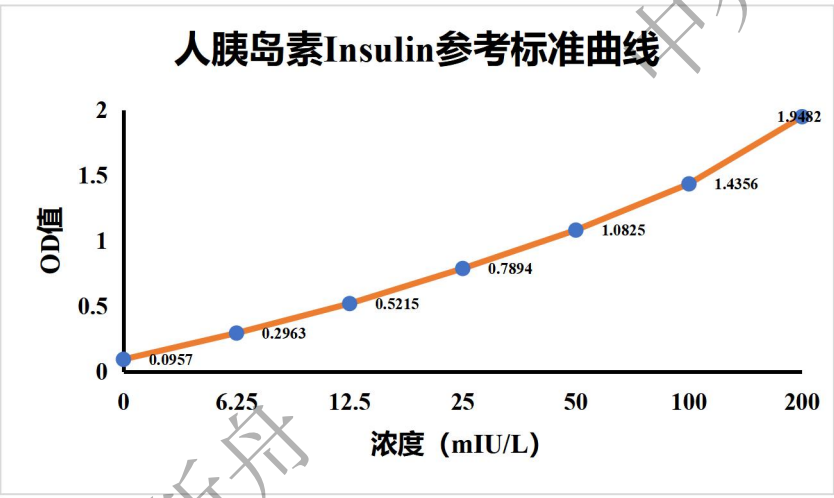
6.加入终止液50ul/孔,混匀后即刻测量OD450值。

7、结果判断:

1.复孔的值在20%的差异范围内结果才有效，复孔的值平均后可作为测量值。

2.每个标准品或标本的OD值应减去本底校正孔的OD值。

3.手工绘制标准曲线。以标准品浓度作横坐标，OD值作纵坐标，以平滑线连接各标准品的坐标点。通过标本的OD值可在标准曲线上查出其浓度。下图是一个参考的标准曲线图：



注意：本图仅供参考，应以同次试验标准品所绘标准曲线计算标本含量，不能代替任何时间所得的分析数据

4.若标本OD值高于标准曲线上限，应适当稀释后重测，计算浓度时应乘以稀释倍数。

8、试剂盒性能参数：

1.灵敏度：多次重复结果表明，最小检出量为1.54mIU/L。

2.特异性：与人的C肽，Proinsulin，IGF-I、IGF-II和大鼠胰岛素、小鼠胰岛素不反应，与猪、绵羊和牛的胰岛素分别有374%、48%和31%的交叉反应性。

3.重复性：板内，板间变异系数均<10%.

9、注意事项：

1.试剂盒请保存在2～8℃。如果长时间不用或不及时用建议把冻干的标准品放-20℃保存。

2.浓缩洗涤液因在低温下可能有结晶，请水浴加热使结晶完全溶解后再配制工作液。

3.标准品复溶加样后，剩余部分请丢弃。

4.底物请勿接触氧化剂和金属。

5.加样时，请及时更换枪头，避免交叉污染。

6.严禁混用不同批号的试剂盒组份。

7.充分混匀对保证反应结果的准确性很重要，在加液后请轻轻叩击边缘以保证混匀。

8.室温反应，请严格控制在25～28℃。

9.洗涤过程是至关重要的，洗涤不充分会使精确度下降并导致结果误差较大

10.试验中标准品和样本检测时建议作双复孔。

11.加样过程中避免气泡的产生。

12.血清和血浆标本的检测时，检测抗体的孵育时间应适当延长。