

小鼠胰岛素ELISA检测试剂盒 货号: EKM006-P

本试剂盒仅供科研使用。**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、sIgA简介:

胰岛素是糖代谢中最主要的激素之一。胰腺的 β 细胞产生胰岛素前体蛋白,前体蛋白被加工成C肽和胰岛素。它们以等摩尔浓度进入血循环中。成熟的胰岛素由A、B两条链组成。这两条链是通过两个二硫键桥接形成有功能的胰岛素分子。

血浆葡萄糖浓度的变化是胰岛素产生并分泌的最主要刺激因素,产生的胰岛素具有一些代谢调节作用。其最主要的作用是,将外周血中糖转运到肝脏中贮存起来。一些诸如肝糖生成障碍或在促进血糖升高的激素诸如胰高血糖素、肾上腺素、生长激素和皮质醇等作用下促进肝糖分解都可拮抗胰岛素的作用。

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偶联的抗小鼠胰岛素抗体时,其中胰岛素的不同位点会与捕获抗体和HRP耦连的抗小鼠胰岛素抗体结合,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。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。

灵敏度: 0.1ng/mL

特异性: 不与IGF-I、IGF-II、小鼠C肽、大鼠C肽反应,与猪胰岛素、绵羊胰岛素、大鼠胰岛素、牛胰岛素及人胰岛素分别有628%, 256%, 146%, 110%和195%交叉反应。

重复性: 板内,板间变异系数均<10%.

3、试剂盒组成:

名称	96孔配置	备注
预包被 96 孔酶标板 Pre-coated Assay Plate	8 孔×12 条	无
标准品 Standard	2 支	按说明书进行稀释
通用稀释液 Universal Diluent	10mL	无

浓缩酶结合物 Streptavidin-HRP	10mL	按说明书进行稀释
20×洗涤液 Wash Buffer (20×)	3mL	按说明书进行稀释
底物 (TMB) TMB Substrate	10mL	无
终止液 Stop Solution	5L	无
封板膜 Plate Sealer	3	无
说明书 Instruction Manual	1 份	无

4、样本处理及要求：

- 试剂盒检测范围不等于样本中待测物的浓度范围**，建议实验前通过相关文献预估样本中待测物的浓度并通过预实验确定样本的实际浓度。如果样本中待测物浓度过高或过低，请对样本做适当的稀释或浓缩。
- 若所检样本不在说明书所列样本类型之中，建议做预实验验证其检测有效性。
- 血清**：将收集于血清分离管的全血样本在室温放置2小时或2-8℃过夜，然后1000×g离心20分钟，取上清即可，或将上清置于-20℃或-80℃保存，但应避免反复冻融。
- 血浆**：用EDTA或肝素作为抗凝剂采集样本，并将样本在采集后的30分钟内于2-8℃1000×g离心15分钟，取上清即可检测，或将上清置于-20℃或-80℃保存，但应避免反复冻融。
- 组织匀浆**：用预冷的PBS (0.01M, pH=7.4)冲洗组织，去除残留血液（匀浆中裂解的红细胞会影响检测结果），称重后将组织剪碎。将剪碎的组织与对应体积的PBS（一般按1:9的重量体积比，比如1g的组织样本对应9mL的PBS，具体体积可根据实验需要适当调整，并做好记录。推荐在PBS中加入蛋白酶抑制剂）加入玻璃匀浆器中，于冰上充分研磨或匀浆机研磨。为了进一步裂解组织细胞，可以对匀浆液进行超声破碎，或反复冻融。最后将匀浆液于5000×g离心5~10分钟，取上清检测。
- 细胞培养物上清**：请1000×g离心20分钟，取上清即可检测，或将上清置于-20℃或-80℃保存，但应避免反复冻融。
- 细胞裂解液**：贴壁细胞用预冷PBS轻轻清洗，然后用胰蛋白酶消化，1000×g离心5分钟后收集细胞；悬浮细胞可直接离心收集。收集的细胞用预冷PBS清洗3次，每 1×10^6 个细胞中加入150-200μL PBS重悬（推荐在PBS中加入蛋白酶抑制剂；若含量很低可适当减少PBS体积）并通过反复冻融或超声使细胞破碎。将提取液于2-8℃，1500×g离心10分钟，取上清检测。
- 其它生物样本**：1000×g离心20分钟，取上清即可检测。
- 样本外观**：样本应清澈透明，悬浮物应离心去除。
- 样本保存**：样本收集后若在1周内进行检测的可保存于4℃，若不能及时检测，请按一次使用量分装，冻存于-20℃（1个月内检测），或-80℃（6个月内检测），避免反复冻融，样本溶血会影响最后检测结果，因此溶血样本不宜进行此项检测。

5、样本稀释方案:

请提前预估样本的浓度范围, 如果您的检测样本需要稀释, 参考稀释方案如下:

稀释 100 倍: 一步稀释。取 5 μ L 样本到 495 μ L 通用稀释液内, 做 100 倍稀释;

稀释 1000 倍: 两步稀释。取 5 μ L 样本到 95 μ L 通用稀释液内, 做 20 倍稀释, 再取 5 μ L 20 倍稀释样本到 245 μ L 通用稀释液内, 做 50 倍稀释, 总共稀释 1000 倍;

稀释 100000 倍: 三步稀释。取 5 μ L 样本到 195 μ L 通用稀释液内, 做 40 倍稀释, 再取 5 μ L 40 倍稀释样本到 245 μ L 通用稀释液内, 做 50 倍稀释, 最后取 5 μ L 2000 倍稀释样本到 245 μ L 通用稀释液内, 做 50 倍稀释, 总共稀释 100000 倍;

每步稀释时取液量不少于 3 μ L, 稀释倍数不超过 100 倍。每步稀释都需混合均匀, 避免起泡。

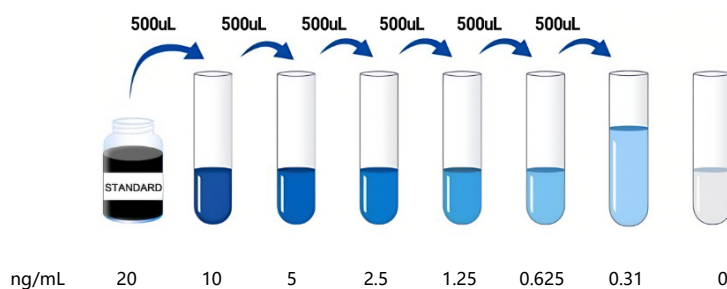
6、实验所需自备试验器材:

1. 酶标仪 (450nm)
2. 高精度移液器及吸头: 0.5-10 μ L、5-50 μ L、20-200 μ L、200-1000 μ L
3. 37 $^{\circ}$ C 恒温箱
4. 蒸馏水或去离子水

7、检测前准备工作:

1. 请提前 10 分钟从冰箱中取出试剂盒, 平衡至室温。
2. **标准品梯度工作液配制:** 加入 1mL 通用稀释液至冻干标准品中, 静置 15 分钟待其完全溶解后轻轻混匀(浓度为 20ng/mL), 然后按照以下浓度: 20ng/mL、10ng/mL、5ng/mL、2.5ng/mL、1.25ng/mL、0.625ng/mL、0.31ng/mL、0ng/mL 进行稀释。

倍比稀释方法: 取 7 支 EP 管, 每管中加入 500 μ L 通用稀释液, 20ng/mL 的标准品工作液中吸取 50 μ L 到第一支 EP 管中混匀配成 10ng/mL 的标准品工作液, 按此步骤往后依次吸取混匀。最后一管直接作为空白孔, 不需要再从倒数第二管中吸取液体, 具体如下图。



- 酶结合物工作液配制：**使用前15分钟将100×浓缩酶结合物于1000×g离心1分钟，以通用稀释液将100×浓缩酶结合物稀释成1×工作浓度(例：10μL浓缩液+990μL通用稀释液)，现配现用。
- 1×洗涤液配制：**取10mL 20×洗涤液到190mL蒸馏水中（从冰箱中取出的浓缩洗涤液可能有结晶，属于正常现象，可放置室温，待结晶完全溶解后再配制）。

8. 操作步骤：

1.从室温平衡10分钟后的铝箔袋中取出所需板条，剩余板条用自封袋密封放回4℃。



2.加样：分别将样本或不同浓度标准品按照100μL每孔加入相应孔中，空白孔加入100μL通用稀释液。盖上封板膜后37℃温育60分钟。
(建议：将待测样本用通用稀释液最低稀释1倍后再加入酶标板内测试。从而减少基质效应对测试结果的影响，最后计算样本浓度时需乘以对应的稀释倍数。所有的待测样本和标准品在检测中建议设立复孔)。



3.分别将标本或不同浓度标准品(10ul/孔)加入相应孔中，快速加入小鼠胰岛素抗体HRP结合物(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次后一次置厚吸水纸上拍干。（也可用洗板机洗板）。



5.加入显色剂TMB100ul/孔，避光室温（25~28℃）孵育20分钟。



6. 加入终止液50ul/孔,混匀后即刻测量OD450值。

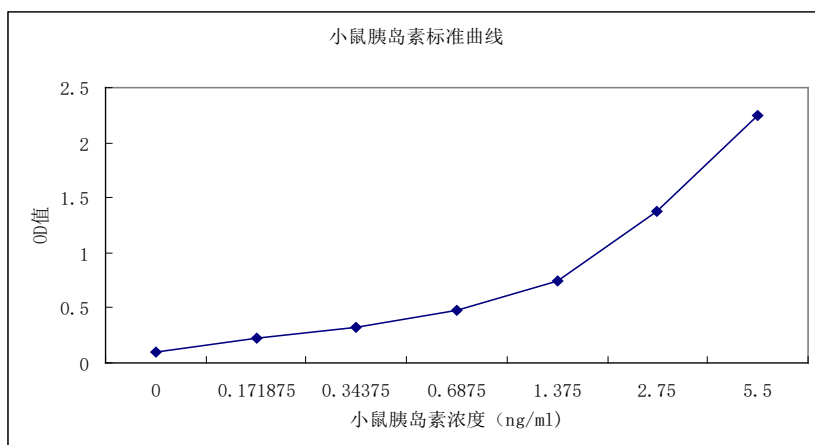
9. 实验结果计算:

结果判断:

1. 计算标准品和样本复孔的平均 OD 值并减去空白孔的 OD 值作为校正值。以浓度为横坐标, OD 值为纵坐标, 在双对数坐标纸上绘出四参数逻辑函数的标准曲线。
2. 若样本 OD 值高于标准曲线上限, 应适当稀释后重测并在计算样本浓度时乘以相应的稀释倍数。

标准曲线

实验者需根据自己的实验建立标准曲线。



11. 问题分析:

若实验效果不好, 请及时对显色结果拍照, 保存实验数据, 保留所用板条及未使用试剂, 然后联系我公司技术支持为您解决问题。同时您也可以参考以下资料:

问题描述	可能原因	相应对策
标曲线性差	标准品稀释不正确	确保标准品按照推荐方法溶解和稀释
	移液不准确	定期校准移液器并检查枪头密封性
	反应液蒸发	用封板膜密封酶标板
	洗板不彻底	足够的洗涤次数和加入足量洗涤液

	孔底有异物	读数前清洁板底
显色弱或无色	孵育时间不够	确保孵育时间
	孵育温度不正确	按推荐温度孵育
	试剂体积添加不足	检查移液器并严格按照操作步骤操作
	稀释不正确	检查试剂稀释步骤
	酶结合物失活	混合酶结合物和底物，通过显色反应检查

OD 值低	酶标仪设置不正确	检查仪器波长
	没加终止液	加入适量终止液
	读板时等待时间太长	及时读板
	样本含量过高	通过预实验确定合适的稀释倍数
	样本含量过低	通过预实验确定合适的稀释倍数
背景高	显色液被污染	更换显色液
	显色时间太长	控制显色时间
	检抗或酶结合物稀释错误	使用推荐稀释方法
	洗板不彻底	足够的洗涤次数和加入足量洗涤液

12、注意事项：

1. 严格按照规定的时间和温度进行温育以保证准确结果。所有试剂都必须在使用前达到室温 20-25℃。使用后立即冷藏试剂。
2. 洗板不正确可能导致不准确的结果。在加入底物前确保尽量吸干孔内液体。整个过程中不要让微孔干燥时间过长。
3. 清洁板底残留的液体和手指印，否则影响 OD 值。
4. 底物显色液应呈无色的颜色，已经变蓝的底物液不能使用。
5. 避免试剂和样本的交叉污染以免造成错误结果。
6. 在储存和温育时避免强光直接照射。
7. 任何反应试剂不能接触漂白溶剂或漂白溶剂所散发的强烈气体。任何漂白成分都会破坏试剂盒中试剂的生物活性。
8. 不能使用过期产品，不同货号 and 批号组分不得混用。
9. 试剂盒以外来源的重组蛋白可能会出现与本试剂盒抗体不匹配而不被识别的情况。
10. 如果可能传播疾病，所有的样本都应管理好，按照规定的程序处理样本和检测装置。

中乔新舟文献奖励

凡使用中乔新舟的产品的客户，在 SCI 期刊上发表文献，且在文献中标注产品来源于 Shanghai Zhong Qiao Xin Zhou Biotechnology Co.,Ltd.或 ZQXZbio 标注相应产品名称及货号，均可参与该活动。自 2025 年 1 月 1 日起，中乔新舟文献引用奖励按照如下规则进行：

文献引用奖励		
SCI 期刊杂志	影响因子	奖学金
	$1 \leq IF < 5$ 分	100 元
	$5 \leq IF < 10$ 分	200 元
	$10 \leq IF < 15$ 分	300 元
	$15 \leq IF < 25$ 分	600 元
	$IF \geq 25$ 分	800 元

1. 文献已发表，且申请人为第一作者或第一通讯作者；
2. 文章发表于 2025 年 1 月 1 日后；
3. 提交文献奖励申请，提供文献全文(PDF 格式)，并默认同意在中乔新舟®官网、公众号、知乎、小红书、抖音等社交媒体平台展示；
4. 每篇文献仅限领取一次奖励；
5. 影响因子(IF)以申请奖励时的分值为准；
6. 活动解释权归中乔新舟®所有。