



Mouse/Rat Insulin Competitive ELISA Kit 检测试剂盒（酶联免疫吸附法）说明书

【货号】EK3220

【包装规格】48T、96T

【预期用途】定量检测小鼠、大鼠血清、血浆和细胞培养上清中的胰岛素(Insulin)浓度。

【背景介绍】

胰岛素是一种由胰岛β细胞和一些硬骨鱼布氏体分泌产生的肽类激素。它通过促进脂肪、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。这些组织吸收的葡萄糖转化为糖原或者脂肪(甘油三酯)，而肝脏是个例外，其吸收的葡萄糖可以转化为糖原和脂肪。肝脏中的葡萄糖产量受血液中高浓度胰岛素强烈抑制。血液中胰岛素浓度高时，它就是一种同化激素，可促进血液中的小分子转化为细胞内的大分子。血液中胰岛素浓度低时，它通过促进广泛的分解代谢而产生相反的效果。当胰岛β细胞被自身免疫过程破坏，胰岛素就不再合成或者分泌到血液中，进而导致1型糖尿病。遗传易感性和环境因素的综合影响会导致胰岛素抵抗，这就是2型糖尿病。另外，胰岛β细胞产生过量的胰岛素或反应性低血糖都与胰岛素瘤有关。

【检测原理】

本试剂盒采用固相竞争酶联免疫吸附检测技术。特异性抗小鼠/大鼠Insulin抗体预包被在高亲和力的酶标板上。酶标板孔中加入生物素化的Insulin和未标记的Insulin或样本，竞争结合包被抗体上有限的结合位点。洗涤去除未结合的物质后，加入辣根过氧化物酶标记的链霉亲和素(Streptavidin-HRP)。洗涤后，加入显色底物TMB，避光显色。颜色反应的深浅与样本中Insulin的浓度成反比。加入终止液终止反应，在450nm波长(参考波长570-630nm)测定吸光度值。

【产品组成】

组分	编号	EK3220 - 48	EK3220 - 96
酶标板	EK3220P	48T	96T
Insulin标准品	EK3220S1	1 vial	2 vials
Insulin偶联物	EK3220S2	1 vial	1 vial
链霉亲和素	E0290	1 vial	1 vial
标准品稀释液	E0260	5 ml	5 ml
10×检测缓冲液	E0310	5 ml	5 ml
显色底物	E0230	6 ml	11 ml
终止液	E0300	11 ml	11 ml
20×洗液	E0281	50 ml	50 ml
封板膜	E0200	6	6

注：不同批号试剂盒中的组分不可以互换使用。如上述组分有任何损坏或遗失，请致电400-6721-600与我们的客服部门联系。未经授权或同意，我们不接受无理由的退货。

完成实验需要但未提供的：

- 1) 能够检测450nm吸光度的酶标仪，参考波长570nm或630nm，涡旋振荡器、微孔板振荡器；
- 2) 移液器及枪头、加样槽；试剂用的试管、离心管、量筒等；
- 3) 蒸馏水或去离子水；

【储存条件及有效期】

2-8℃保存，失效日期参见试剂盒标签；

开封后试剂盒：预包被酶标板2~8℃大约可贮存1个月（未使用的板条请放回铝箔袋，封好封口）；标准品-20℃大约可贮存1个月（重溶使用1次后丢弃）；其它组分在2~8℃大约可以贮存1个月。

【样本处理】

1) 细胞培养上清：300×g离心10分钟去除沉淀物，即刻检测，或者分装，-20℃以下贮存。

2) 血清样本：离心管收集血清。血样凝集30分钟后，1,000×g离心10分钟。吸取血清样本之后即刻检测，或者分装，-20℃以下贮存。

3) 血浆样本：EDTA、枸橼酸钠或肝素抗凝收集血浆样本。1,000×g离心30分钟收集样本。即刻检测，或者分装，-20℃以下贮存。

注意：本试剂盒可能适用于其它生物学样本。细胞培养上清、血清和血浆已经过验证。

检测前，样本中可见的沉淀必须去除。不要使用严重溶血或高血脂的样本。样本应分装并贮存于-20℃，以避免待测物质活性的丢失。如果在24小时内检测，样本可以存放在2~8℃。

避免样本的反复冻融。在检测前，冷冻样本应缓慢地恢复至室温(25℃±3℃)，轻柔地混匀。

【检测前准备】

1) 试剂准备：检测前请将所有的试剂、样本恢复至室温(25℃±3℃)，如果浓缩的试剂出现结晶，37℃温浴，直至结晶全部溶解。显色底物在添加之前应是无色的，请保持显色底物始终处于避光态。

“1×洗液”配制：吸取20×洗液50ml至1L的量筒，加蒸馏水至1,000ml，轻轻混匀，避免泡沫。转移至干净瓶内。2-8℃贮存，1×洗液可稳定保存30天。

“1×检测缓冲液”配制：吸取10×检测缓冲液5ml至100ml量筒，加蒸馏水至50ml，轻轻混匀，避免泡沫。2-8℃贮存，1×检测缓冲液可稳定保存30天。

“Insulin偶联物工作液”配制：室温(25℃±3℃)下充分解冻后使用。开盖前短暂离心。根据标准品和待测样本的数量，用1×检测缓冲液按1:100稀释浓缩的Insulin偶联物。

“链霉亲和素工作液”配制：稀释前充分混匀。根据标准品和待测样本的数量，用1×检测缓冲液按1:100稀释链霉亲和素。

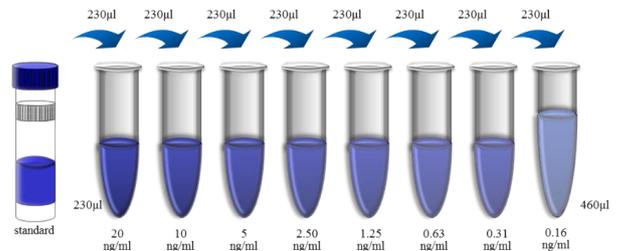
注意：Insulin偶联物工作液、链霉亲和素工作液均应在30分钟内使用。

2) 样本稀释：为了保证实验成功，由于对样本的处理方式，培养条件等不同，建议首次使用本试剂盒前先进行一次预实验以摸索最佳的样本浓度，避免因浓度过高使显色反应超出酶标仪的检测上限或稀释倍数过大低于试剂盒灵敏度。对于样本的稀释，请用1×检测缓冲液稀释血清/血浆样本，用细胞培养基稀释细胞培养上清。

3) 标准曲线的制备：开盖前短暂离心，用蒸馏水在聚丙烯管内重溶标准品，重溶体积标注于标准品的标签上。轻柔地涡旋震荡，确保充分混匀，重溶后标准品的浓度为40ng/ml。重溶后静置10-30分钟。稀释前充分混匀。

● 血清/血浆样本标准曲线的制备：取230 μl重溶后的标准品，加入230 μl标准品稀释液，作为标准曲线的最高浓度(20 ng/ml)。在每一个试管中加入230 μl标准品稀释液。使用高浓度标准品做1:1系列稀释。每次移液时，请确保充分混匀。以标准品稀释液作为标准曲线的零浓度。

● 细胞培养上清样本标准曲线的制备：取230 μl重溶后的标准品，加入230 μl细胞培养基，作为标准曲线的最高浓度(20 ng/ml)。在每一个试管中加入230 μl细胞培养基。使用高浓度标准品做1:1系列稀释。每次移液时，确保充分混匀。以细胞培养基作为标准曲线的零浓度。



注：如若标准品发生部分潮解，此为保存条件变化所致，并不影响组分的使用。各组分稀释液中可能会观察到蛋白沉淀，该沉淀不影响使用，可以忽略，或者可通过6,000×g离心5分钟去除沉淀。

4) 反应板设置：每块板或每批酶标条都须至少包含2个空白孔、2个非特异性结合孔(NSB)、2个最大结合孔(B₀)以及2条包含8个点的标准曲线。

注意：为了确保准确、可重复的结果，每次检测都须包含以上设置。每

个样本应做两个梯度的稀释，每个梯度做2次重复。为了统计的目的，我们建议每个样本做3次重复。

推荐的反应板设置和加样汇总如下所示。实验者可根据具体实验，更改孔的位置和类型。

【检测方法】

- 1) 准备好所有需要的试剂及工作浓度标准品。
- 2) 将不需要的板条拆卸下来，放回装有干燥剂的铝箔袋，重新封好封口。**在任何情况下，避免接触微孔板的内表面。**
- 3) 浸泡酶标板：加入300μl 1×洗涤液静置浸泡30秒。为了获得理想的实验结果浸泡是必须的。弃掉洗液之后，在吸水纸上将微孔板拍干。洗板完成之后，请立即使用微孔板，不要让微孔板干燥。
- 4) 加标准品：除了Blank和TA孔空白，标准品孔中加入100 ul系列稀释的标准品。NSB孔和B0孔加入100μl标准品稀释液(血清/血浆样本)或培养基(细胞培养上清样本)。
- 5) 加样本：**血清/血浆**：样本孔加入80 μl 1×检测缓冲液和20 μl样本。**细胞培养上清**：样本孔加入100μl细胞培养上清
- 6) 加偶联物：除了Blank和TA孔空白，NSB孔加入50μl 1×检测缓冲液，其余每孔加入50μl稀释的“Insulin偶联物工作液”(参见试剂准备)。保证步骤4、5和6连续加样，不要间断。加样过程在15分钟内完成。
- 7) 孵育：使用封板膜封板。100-300转/分钟振荡（保证每孔溶液不撒出且能充分混匀即可），室温（25℃±3℃）孵育1.5小时。
- 8) 洗涤：弃掉液体，每孔加入300μl洗液洗板，洗涤6次。每次洗板，在吸水纸上拍干。为获得理想的实验性能，必须彻底移除残留液体。
- 9) 加酶孵育：除了TA和Blank孔，其余每孔加入100μl“链霉亲和素工作液”(参见试剂准备)。
- 10) 孵育：使用新的封板膜封板。100-300转/分钟振荡（保证每孔溶液不撒出且能充分混匀即可），室温（25℃±3℃）孵育30分钟。
- 11) 洗涤：重复步骤8)。
- 12) 加酶：TA孔加10 μl“链霉亲和素工作液”(参见试剂准备)。
- 13) 加底物显色：每孔加入100μl显色底物，避光，室温（25℃±3℃）孵育5-30分钟。
- 14) 加终止液：每孔加入100μl终止液。颜色由蓝色变为黄色。如果颜色呈现绿色或者颜色的变化明显不均匀，请轻轻敲击板框，充分混匀。**终止液的添加顺序应与显色底物的添加顺序相同。**

15) 检测读数：在30分钟之内，使用酶标仪进行双波长检测，测定450nm最大吸收波长和570nm或630nm参考波长下的OD值。校准后的OD值为450nm

【标准曲线示例】

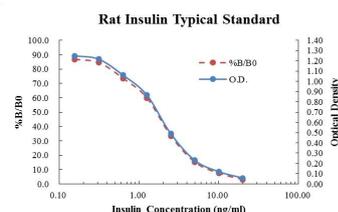
计算标准品和样本的平均OD值，然后减去NSB孔的平均OD值。

以将标准品和样本的校准OD值除以B₀的校准OD值，乘以100，计算得到% B/B₀。将标曲中S1 - S8的% B/B₀作为纵坐标，标准品Insulin浓度取对数后作为横坐标。选择最佳的曲线(如四参数)进行拟合。根据标曲，计算得到Insulin的浓度。

每次检测，每块酶标板都必须设立标准曲线。下面的标准曲线仅作参考。

ng/ml	O.D.	Average	Corrected	%B/B ₀
NSB	0.015	0.015	0.015	-
B ₀	1.329	1.387	1.358	1.343
0.16	1.270	1.229	1.250	1.235
0.31	1.218	1.214	1.216	1.201
0.63	1.062	1.062	1.062	1.047
1.25	0.871	0.862	0.867	0.852
2.50	0.483	0.494	0.489	0.474
5.00	0.238	0.221	0.230	0.215
10.00	0.115	0.123	0.119	0.104
20.00	0.059	0.056	0.058	0.043

组 反应孔	标准品 稀释液	1×检测 缓冲液	Insulin 标准品	样本	Insulin 偶联物	SA-HRP
空白孔	-	-	-	-	-	-
非特异结合孔(NSB)	100 μl	50 μl	-	-	-	100 μl
最大结合孔(B ₀)	100 μl	-	-	-	50 μl	100 μl
偶联物总酶活孔(TA)	-	-	-	-	-	10 μl (加TMB前)
标准品孔	-	-	100 μl	-	50 μl	100 μl
样本孔	-	-	-	100 μl	50 μl	100 μl



【局限性】

- 1) 任何标准品稀释、操作人员、移液技术、洗涤技术、孵育温度、试剂盒保存时间的改变，都将影响结合反应。
- 2) 本试剂盒在设计上去除或降低了生物学样本中的一些内源性干扰因素，并非所有可能的影响因素都已经去除。

【注意事项】

- 1) 本试剂盒用于科学研究，不能用于诊断治疗。
- 2) 所有的样本和试剂被认为具有潜在危害。实验时佩戴乳胶或一次性手套等防护措施。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。
- 3) 只有经过良好实验室培训的工作人员方可使用本试剂盒，请严格按照本说明书操作。
- 4) 为避免微生物的污染，以及试剂与样本间的交叉污染，请使用一次性枪头，不同的试剂，使用不同的枪头和加样槽；使用干净的容器配制试剂。
- 5) 请不要使用其他批号或其他来源的试剂替代本试剂盒中的试剂；请不要使用过期的试剂；在试剂盒的贮存或孵育过程请避免强光照射。
- 6) 显色底物避免与氧化剂和金属接触；暴露于酸性环境会抑制结合。
- 7) 避免气溶胶的产生。
- 8) 液体废弃物的处理。不含酸的液体废弃物，加入1.0%的次氯酸钠，浸泡30分钟。含酸的液体废弃物，请先中和，再加入次氯酸钠。
- 9) 在应用自动洗板机时，加入洗液之后，设置30秒的浸泡程序，或者在不同的洗涤步骤将微孔板掉转180度，这样可以提高分析的准确度。
- 10) 推荐所有的检测样本和标准品在检测中设复孔。

【基本信息】

生产厂家：杭州联科生物技术股份有限公司
 地址：浙江省杭州市萧山区闻堰街道天马路1688号2号楼301室
 技术服务热线：400-6721-600
 网址：www.liankebio.com