EliKine™ 大鼠胰岛素ELISA定量试剂盒

Cat #: KTE3040 Size: 48 T/96 T

	大鼠胰岛素 ELISA 定量试剂盒		
REF	**货号：**KTE3040	LOT	**批号：**见产品标签
	检测范围：0.16 ng/mL-20 ng/mL		**灵敏度：**0.16 ng/mL
	精密度：板内变异系数<10%, 板间变异系数<12%		**回收率：**范围从 85%到 116%，平均回收率 103%
	特异性：检测具有高灵敏度和优良的特异性。未观察到和大鼠胰岛素类似物之间的显着交叉反应或干扰。		
	适用样本：血清（浆）、细胞培养上清		
	保质期：4℃，避光保存 24 个月		

原理

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。EliKine™ 大鼠胰岛素 ELISA 定量试剂盒采用竞争性抑制酶免疫分析技术。特异性抗大鼠 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，颜色反应的深浅与 Rat Insulin 的浓度成反比。停止显色并测量颜色的强度。

包装清单

试剂盒组分	规格		储存条件
	48 T	96 T	
Rat Insulin Microplate	48 wells	96 wells	4℃
Rat Insulin Standard (lyophilized)	1	2	4℃
Standard Diluent	5 mL	5 mL	4℃
Assay Buffer (10×)	5 mL	5 mL	4℃
Biotin Conjugated Rat Insulin (100×)	1	1	4℃

Not for further distribution without written consent.Copyright © Abbkine, Inc.

Streptavidin-HRP (100×)	1	1	4℃
HRP Substrate (TMB)	6 mL	11 mL	4℃，避光保存
Stop Solution	11 mL	11 mL	4℃
Wash Buffer (20×)	50 mL	50 mL	4℃
Plate Covers	6	6	室温

自备耗材

- 酶标仪（能测 450 nm 处的吸光度）
- 多通道移液器或自动洗板机
- 恒温箱、低温离心机
- 可调节式移液枪及枪头
- 去离子水

试剂准备

Standard Diluent：即用型；使用前，平衡到室温；4℃保存。Standard Diluent 用于稀释标准品。

1×Assay Buffer：使用前，平衡到室温，用去离子水按 1:10 的比例稀释 Assay Buffer (10×)得到 1×Assay buffer，轻轻混合以避免起泡。4℃保存，此溶液可稳定保存 30 天。1×Assay buffer 用于稀释血清和血浆样品、Biotin Conjugated Rat Insulin (100×)和 Streptavidin-HRP (100×)。

Rat Insulin Standard: 加入标准品的标签上标注重悬体积的无菌水复溶 Rat Insulin Standard 得到 40 ng/mL 标准品。在进行稀释之前，将标准品至少放置 15 min 并轻轻晃动，复溶后 Standard 可在-20℃保存 1 个月，重溶使用 1 次后丢弃。

1×Biotin Conjugated Rat Insulin：稀释前充分混合。根据标准品和样品所需要的量，在干净的塑料管中用 1×Assay buffer 对 Biotin Conjugated Rat Insulin (100×)进行 1:100 稀释。1×Biotin Conjugated Rat Insulin 应在稀释后 30 min 内使用。

1×Streptavidin-HRP：稀释前充分混合。根据标准品和样品所需要的量，在干净的塑料管中用 1×Assay buffer 对 Streptavidin-HRP (100×)进行 1:100 稀释。1×Streptavidin-HRP 应在 30 min 内使用。

HRP Substrate (TMB)：即用型；使用前，平衡到室温；4℃避光保存。

Stop Solution：即用型；使用前，平衡到室温；4℃保存。

1×Wash Buffer: 使用前平衡到室温，用去离子水进行 1:20 稀释得到 1×Wash buffer。 轻轻混合以避免起泡，室温保存，此溶液可稳定保存 30 天。

标准曲线设置：按下表所示，用 Standard Diluent 将 40 ng/mL 标准品稀释为 20、10、5、2.5、 1.25、0.63、0.31 和 0.16 ng/mL 的 Rat Insulin 标准品。

序号	标准品体积	Standard Diluent 体积（μL）	标准品浓度（ng/mL）
Std.1	230 μL of 40 ng/mL	230	20
Std.2	230 μL of Std.1 (20 ng/mL)	230	10
Std.3	230 μL of Std.2 (10 ng/mL)	230	5
Std.4	230 μL of Std.3 (5 ng/mL)	230	2.5
Std.5	230 μL of Std.4 (2.5 ng/mL)	230	1.25
Std.6	230 μL of Std.5 (1.25 ng/mL)	230	0.63
Std.7	230 μL of Std.6 (0.63 ng/mL)	230	0.31
Std.8	230 μL of Std.7 (0.31 ng/mL)	230	0.16

注意：每次实验都需要新配制标准品。

Not for further distribution without written consent.Copyright © Abbkine, Inc.

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 非特异结合孔（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。

	Standard Diluent (μL)	1×Assay Buffer (μL)	标准品 (μL)	样本 (μL)	1×Biotin Conjugated Rat Insulin (μL)	1× Streptavidin-HRP (μL)
空白孔	—	—	—	—	—	—
非特异结合孔（NSB）	100	50	—	—	—	100
最大结合孔（B0）	100	—	—	—	50	100
偶联物总酶活孔（TA）	—	—	—	—	—	10（加 TMB 前）
标准品孔	—	—	100	—	50	100
样本孔	—	—		100	50	100

样本制备

1. 细胞培养上清：离心除去颗粒，立即测定或分装-20℃保存，避免反复冻融。
2. 血清：使用血清分离管，让样品在室温下凝结 30 min，然后 1,000 g 离心 15 min。 取上层血清立即测定或分装-20℃保存，避免反复冻融。
3. 血浆：使用 EDTA、肝素或柠檬酸盐作为抗凝剂收集血浆。在收集后 30 min 内 1,000 g 离心 15 min。立即测定或分装-20℃保存，避免反复冻融。

注意：不要使用严重溶血或脂血的标本。如果样品要在 24 h 内使用，则可以将其储存在 2 至 8℃，避免反复冻融。

实验步骤

1. 从板框上取下多余的板条，将它们放回装有干燥剂包的铝箔袋中，然后重新密封。
2. 除去每孔中的液体并洗涤。使用多通道移液器或自动清洗机每孔加入 300 μL 1×Wash buffer 静置浸泡 30 s，进行洗涤。在每个步骤中完全去除液体对于获得良好性能至关重要。最后一次洗涤后，倒置酶标板并用干净的纸巾吸干以除去任何剩余的 1×Wash buffer。洗板完成之后，请立即使用微孔板，不要让微孔板干燥。
3. 标准品：除了 Blank 和 TA 孔，标准品孔中加入 100 μL 系列稀释的标准品。NSB 孔加 100 μL Standard Diluent，B0 孔加入 100 μL Standard Diluent。(参考"试剂准备"中"反应板设置")。
4. 加样本：血清/血浆：样本孔中加入 80 μL 1×Assay Buffer 和 20 μL 预稀释样本；细胞培养上清：样本孔加入 100 μL 细胞培养上清（详见样本制备）。
5. 加偶联竞争物：除了 Blank 和 TA 孔，NSB 孔加入 50 μL 1×Assay Buffer，其余每孔加入 50 μL1×Biotin Conjugated Rat Insulin。保证步骤 3、4、5 连续加样，不要间断。 加样过程在 15 min 内完成。给酶标板覆膜，在室温下孵育 1.5 h。
6. 重复步骤 2 中的洗涤 6 次。
7. 除了 Blank 和 TA 孔每孔加入 100 μL 1×Streptavidin-HRP。给酶标板覆膜，在室温下孵育 30 min，注意避光。
8. 重复步骤 2 中的洗涤 6 次。
9. TA 孔加 10 μL 1×Streptavidin-HRP。
10. 每孔加入 100 μL HRP Substrate (TMB)。给酶标板覆膜，并在室温下避光孵育 5-30 min。
11. 每孔加入 100 μL Stop Solution，Stop Solution 应按照与 TMB 相同的顺序加到板中。孔中的颜色应从蓝色变为黄色。如果孔中的颜色为绿色或颜色变化不均匀，请轻轻敲击板以确保彻底混合。
12. 在 30 min 内，测定每孔 450 nm 处的吸光值。

Not for further distribution without written consent.Copyright © Abbkine, Inc.

注意：5-30 min 显色时间为经验范围，每个具体的实验，可根据以下情况，确定大致的显色时间。

1) 肉眼观察：标曲 S5 孔有淡蓝色、Blank 孔无明显蓝色时，即可终止；

2) 仪器判断：630 nm 左右波长下，标曲 S1 孔的 OD 值达到 0.5-0.7、S5 孔的 OD 值达到 0.05-0.08、Blank 孔的 OD 值小于 0.05 时，即可终止。

结果计算

1. 计算标准品和样本的平均 OD 值， 然后减去 NSB 的 OD 值，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。

2. 标准曲线的绘制: 将标曲中 Std.1 -Std.8 的% B/B0 作为纵坐标, 标准品 Rat 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。根据标准曲线，计算得到 Rat Insulin 的浓度。

注意:标曲的计算不需要用到 Blank 和 TA 孔的 OD 值。它们是作为反应体系的诊断工具。标准曲线最高浓度点的终浓度为 20 ng/mL。如果样本进行了其它方式的稀释，计算样本浓度时请乘以相应的稀释倍数。

结果展示

典型标准曲线（$R^2 \geq 0.99$）

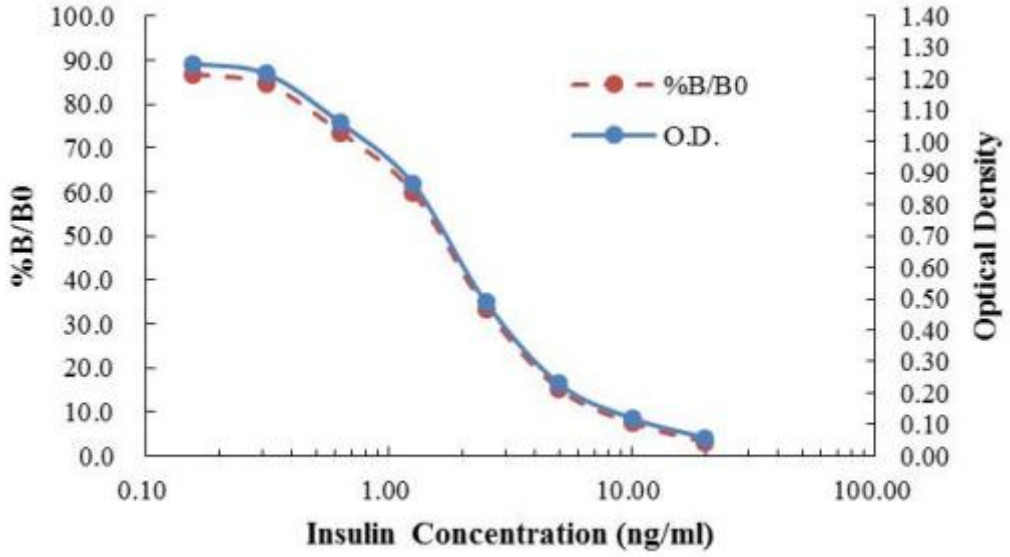


Figure1. 96 孔板分析的大鼠胰岛素标准曲线。数据和曲线仅供参考，实验者需根据自己的实验建立标准曲线

注意事项

1. 如果 Standard Diluent 和 Assay Buffer (10×)出现颜色变黄，少量沉淀等现象，是因为试剂中含有血清导致，离心去掉沉淀即可，不影响正常使用。
2. 不同批次号、不同厂家之间的组分不要混用；否则，可能导致结果异常。
3. 勤换吸头，避免各组分之间的交叉污染。
4. 为确保准确的结果，在孵育步骤中必须正确粘附板贴。
5. Stop Solution 有一定的腐蚀性，操作时请做好防护措施。

免责声明

本产品仅供科学研究使用，不适用于临床诊断。

Not for further distribution without written consent.Copyright © Abbkine, Inc.