

EliKine™ 大鼠胰高血糖素样肽-1竞争法ELISA定量试剂盒

Cat #: KTE9009

Size: 48 T/96 T

	大鼠胰高血糖素样肽-1 竞争法 ELISA 定量试剂盒		
REF	货号: KTE9009	LOT	批号: 见产品标签
	检测范围: 12.35 pg/mL-1,000 pg/mL		灵敏度: 4.12 pg/mL
	精密度: 板内变异系数<10%, 板间变异系数<12%		回收率: 范围从 98%到 116%, 平均回收率 106%
	特异性: 检测具有高灵敏度和优良的特异性。未观察到和大鼠胰高血糖素样肽-1 (GLP-1) 类似物之间的显著交叉反应或干扰。		
	适用样本: 血清 (浆)、组织匀浆、细胞裂解液、细胞培养上清		
	保质期: 4°C, 避光保存 12 个月		

原理

胰高血糖素样肽-1 (GLP-1) 是肠道 L 细胞在营养消耗时释放的肽激素。它与胰腺 GLP-1 受体结合, 通过增强胰腺β细胞葡萄糖诱导的胰岛素分泌, 增加胰岛素表达, 显示出多种降糖作用。EliKine™ 大鼠胰高血糖素样肽-1 竞争法 ELISA 定量试剂盒采用竞争法来定量样品中的大鼠胰高血糖素样肽-1 (GLP-1)。用抗大鼠胰高血糖素样肽-1 (GLP-1) 的特异性抗体包被于酶标板上, 将待测抗原 (样品或标准品) 和生物素标记的抗原同时加入酶标板的孔中, 待测抗原与生物素标记抗原对特异性抗体进行竞争结合。洗涤后, 将专有的链霉亲和素-HRP 偶联物加入孔中。在洗涤去除任何未结合的链霉亲和素-HRP 试剂后, 加入显色底物 (TMB), TMB 在 HRP 催化下呈现蓝色, 加终止液后变成黄色。用酶标仪在 450 nm 波长处测 OD 值, 大鼠胰高血糖素样肽-1 (GLP-1) 浓度与 OD450 值之间呈反比。

包装清单

试剂盒组分	规格		储存条件
	48 T	96 T	
Rat GLP-1 Microplate	48 wells	96 wells	4°C
Rat GLP-1 Standard (lyophilized)	1	2	4°C
Sample Diluent (5×)	3.5 mL	7 mL	4°C
Assay Buffer (5×)	3.5 mL	7 mL	4°C
Biotin Conjugated Rat GLP-1(100×)	30 µL	60 µL	4°C
Streptavidin-HRP (100×)	60 µL	120 µL	4°C
HRP Substrate (TMB)	5 mL	10 mL	4°C, 避光保存

Stop Solution	5 mL	10 mL	4°C
Wash Buffer (20×)	25 mL	50 mL	4°C
Plate Covers	1	2	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、匀浆器（如果是组织样本）
- 可调节式移液枪及枪头
- 去离子水、PBS

试剂准备

1×Sample Diluent: 使用前，平衡到室温，用去离子水按 1:5 的比例稀释 Sample Diluent (5×)得到 1×Sample Diluent，轻轻混合以避免起泡。4°C保存，此溶液可稳定保存 30 天。1×Sample Diluent 用于稀释标准品和样本。

1×Assay Buffer: 使用前，平衡到室温，用去离子水按 1:5 的比例稀释 Assay Buffer (5×)得到 1×Assay buffer，轻轻混合以避免起泡。4°C保存，此溶液可稳定保存 30 天。1×Assay buffer 用于稀释 Biotin Conjugated Rat GLP-1 (100×)和 Streptavidin-HRP (100×)。

Rat GLP-1 Standard: 加入 250 µL 1×Sample Diluent 复溶 Rat GLP-1 Standard 得到 1,000 pg/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。

1×Biotin Conjugated Rat GLP-1: 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 GLP-1 (100×)进行 1:100 稀释。1×Biotin Conjugated Rat GLP-1 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°C避光保存。

Stop Solution: 即用型；使用前，平衡到室温；4°C保存。

1×Wash Buffer: 使用前平衡到室温，Wash Buffer (20×)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 1×Sample Diluent 将 1,000 pg/mL 标准品稀释为 333.33、111.11、37.04、12.35 和 0 pg/mL 的 Rat GLP-1 标准品。

序号	标准品体积	1×Sample Diluent 体积 (µL)	标准品浓度 (pg/mL)
Std.1	250 µL of 1,000 pg/mL	0	1,000
Std.2	80 µL of Std.1 (1,000 pg/mL)	160	333.33
Std.3	80 µL of Std.2 (333.33 pg/mL)	160	111.11
Std.4	80 µL of Std.3 (111.11 pg/mL)	160	37.04
Std.5	80 µL of Std.4 (37.04 pg/mL)	160	12.35
Std.6	0	160	0

注意：每次实验都需要新配制标准品。

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°C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°C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。

4. 组织匀浆：用预冷的 PBS (0.01M, pH=7.4) 冲洗组织，去除残留血液，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 0.1 g 的组织样品对应 0.9 mL 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) 加入匀浆器中，在冰上充分研磨。为了进一步裂解组织细胞，可以对匀浆液进行超声 2 min (功率 20% 或 200 W，超声 3 s，间隔 7 s，重复 12 次) 破碎。最后将匀浆液于 4℃，10,000 g 离心 10 min，取上清检测。

5. 细胞提取液：贴壁细胞用冷的 PBS 轻轻清洗，然后用胰蛋白酶消化，1,000 g 离心 5 min 后收集细胞；悬浮细胞可直接离心收集。收集的细胞用冷的 PBS 洗涤 3 次。每 10^6 个细胞中加入 150-200 μ L PBS 重悬 (推荐在 PBS 中加入蛋白酶抑制剂；若含量很低可减少 PBS 的体积) 并通过超声 2 min (功率 20% 或 200 W，超声 3 s，间隔 7 s，重复 12 次) 使细胞破碎。将提取液于 4℃，10,000 g 离心 10 min，取上清检测。

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。测定前，应将冷冻样品缓慢升至室温并轻轻混合。

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，重复该过程总共洗涤 3 次。使用多通道移液器或自动清洗机每孔加入 250 μ L 1×Wash buffer 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。
3. 每孔加入 50 μ L 稀释的标准品或样品，建议所有标准品和样品做复孔。然后每孔加入 50 μ L 稀释的 1×Biotin Conjugated Rat GLP-1，保证连续加样，不要间断，加样过程在 15 min 内完成。NSB 孔 (非特异结合孔) 加 50 μ L 1×Sample Diluent 和 50 μ L 1×Assay Buffer，给酶标板覆膜，在 37℃ 孵育 1 h。
4. 重复步骤 2 中的洗涤 5 次。
5. 每孔加入 100 μ L 稀释的 1×Streptavidin-HRP。给酶标板覆膜，在 37℃ 孵育 1 h。
6. 重复步骤 2 中的洗涤 5 次。
7. 每孔加入 90 μ L HRP Substrate (TMB)。给酶标板覆膜，并在 37℃ 避光孵育 3-5 min。该反应较快，肉眼观察标曲 S5 和 S6 孔有明显蓝色时，即可终止。
8. 每孔加入 50 μ L 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。
9. 在 30 min 内，测定每孔 450 nm 处的吸光值。

结果计算

1. 计算每个标准品和样品的复孔平均 OD 值，并减去 NSB 孔平均 OD 值。
2. 标准曲线的绘制：以标准品浓度为 x 轴，各标准品的平均吸光度为 y 轴，绘制标准曲线。可以使用作图软件来创建标准曲线。

注意：如果样品被稀释，从标准曲线读取的浓度必须乘以稀释系数。

结果展示

典型标准曲线 ($R^2 \geq 0.99$)

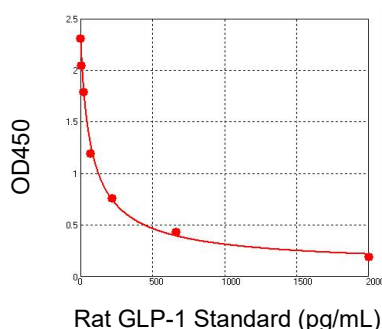


Figure1. 96 孔板分析的 Rat GLP-1 标准曲线。数据和曲线仅供参考，实验者需根据自己的实验建立标准曲线

注意事项

- 1. 如果 Sample Diluent (5×)和 Assay Buffer (5×)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。

常见问题

问题	原因	解决建议
标准曲线无线性	加样不准	检查移液器
	稀释不当	开管前轻柔搅拌和旋转标准品保存管使粉末完全溶解
信号过低	样本孵育时间过短	确保足够的孵育时间；标准/样品孵育时间增加到 2 或 3 小时
	试剂体积不足或稀释不当	检查移液器并确保准备充分
	TMB 孵育时间过短	加 Stop Solution 之前，确保有足够的孵育时间，直到出现蓝色
高背景/CV 值过高	洗板不充分	仔细检查清洗步骤。如果使用洗板机，检查所有接口
	Wash Buffer 被污染	准备新鲜的 Wash Buffer
低灵敏度	试剂盒保存不当	复溶的标准品-20℃保存（避免反复冻融），其他组分 4℃保存，TMB 注意避光
	终止问题	测量读数前需在所有孔中加入 Stop Solution 终止
稀释液沉淀	稀释液中有沉淀或凝结	稀释液缓慢加热至 37℃，沉淀可以复溶

相关产品

Catalog No.	Product Name
KTE7019	EliKine™ 小鼠胰高血糖素样肽-1 竞争法 ELISA 定量试剂盒

免责声明

本产品仅供科学研究使用，不适用于临床诊断。

