

## Mouse Insulin ELISA Kit (Ultrasensitive)

产品编号	产品名称	包装
PI602	Mouse Insulin ELISA Kit (Ultrasensitive)	96次

### 产品简介:

- 碧云天的Mouse Insulin ELISA Kit (Mouse Insulin Enzyme-Linked ImmunoSorbent Assay Kit), 即小鼠胰岛素酶联免疫吸附检测试剂盒, 是一种用于特异性地超高灵敏地定量检测小鼠血清、血浆、细胞或组织裂解液、或细胞培养上清液中的胰岛素的ELISA试剂盒。最少5 $\mu$ l小鼠血清即可检测, 5 $\mu$ l普通小鼠血清可以导致吸光度比本底增加约0.1(不同小鼠略有不同), 使用10 $\mu$ l小鼠血清检测可以获得非常理想的检测数据。本试剂盒不仅适用于常规的小鼠血清胰岛素水平检测, 还特别适合于糖耐量实验(Glucose tolerance test, GTT)时测定每个时间点的血清胰岛素水平。
- 本产品检测灵敏度高, 特异性强, 重复性好。最小检出量为0.1ng/ml, 10 $\mu$ l 0.13ng/ml小鼠胰岛素标准品可以导致吸光度比本底增加约0.1。与IGF-I、IGF-II、小鼠C肽、大鼠C肽均没有交叉反应, 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。板内、板间变异系数均小于10%。
- Insulin即胰岛素, 是由胰脏内的胰岛 $\beta$ 细胞分泌产生的, 分子量约5.8kDa。胰岛 $\beta$ 细胞首先合成含有信号肽(24个氨基酸残基)的前胰岛素原(preproinsulin), 该信号肽将前胰岛素原定位到粗面型内质网。前胰岛素原的信号肽被剪切后形成胰岛素原(proinsulin), 并被释放到粗面型内质网腔内, 随后在其中形成3个二硫键并正确折叠。随后胰岛素原进入高尔基体, 经蛋白水解酶的作用, 生成C肽(C-peptide)和由A链和B链通过两个二硫键连接起来的胰岛素。1923年和1958年, 胰岛素的发现和其氨基酸序列测定都获得了诺贝尔奖。1965年, 中国科学家实现人工全合成结晶牛胰岛素, 也是生命科学史上的重要成果。胰岛素的分泌主要受血糖水平的调控, 血液中葡萄糖水平升高时, 更多的葡萄糖通过GLUT2进入 $\beta$ 细胞, 并产生更多的ATP, ATP水平的升高导致ATP敏感的SUR1/Kir6.2钾离子通道关闭, 使细胞内钾离子积聚, 从而引起细胞膜去极化, 引发电压门(voltage-gated)钙离子通道打开, 细胞内钙离子浓度升高, 最终导致胰岛素的分泌。胰岛素的分泌分为两个时段, 第一个时段通常受血糖调控, 持续时间约为10分钟; 第二个时段是一个比较持续和缓慢的过程, 通常分泌的高峰出现在第一个时段后的2-3小时, 并且不受血糖水平影响。胰岛素的分泌不仅受葡萄糖调控, 也受乳糖、核糖、精氨酸和亮氨酸等氨基酸、副交感神经释放的乙酰胆碱、肠道分泌的肠促胰岛素(incrutin)例如glucagon-like peptide-1 (GLP-1)和glucose-dependent insulinotropic peptide (GIP)、胆囊收缩素(cholecystokinin)、促胰岛素分泌的磺脲(sulfonylurea)类药物等的影响。胰岛素的释放可被紧张时释放的去甲肾上腺素(norepinephrine)、交感神经释放的儿茶酚胺(catecholamine)、以及胰高血糖素等所抑制。

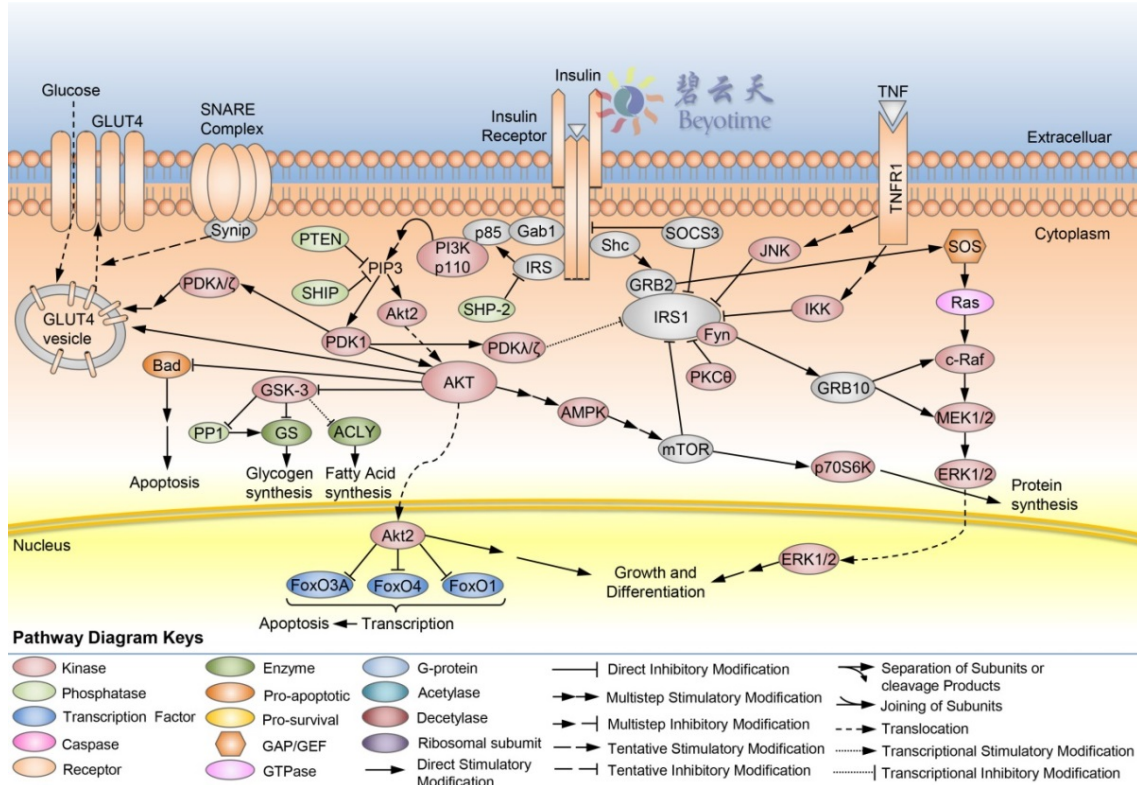


图1. Insulin的信号通路示意图

- Insulin的信号通路是一个比较复杂的信号通路，主要是胰岛素与属于酪氨酸激酶的胰岛素受体(Insulin receptor)结合，从而激活PI(3)K-Akt信号通路。Insulin的信号通路参见图1。
- 胰岛素的主要生物学功能是降低血糖，促进合成代谢。胰岛素可以促进肝脏、肌肉、脂肪等器官和组织的葡萄糖摄入，抑制糖异生(gluconeogenesis)，促进糖原合成等。同时胰岛素也可促进脂质合成和储存，抑制脂质分解，促进蛋白合成并抑制蛋白降解，促进DNA和RNA合成，抑制自噬(autophagy)。胰岛素分泌不足或胰岛素敏感性下降，导致不能有效降低血糖，是糖尿病发生的主要原因。胰岛素分泌过量时，会导致低血糖，甚至出现惊厥、昏迷和休克。
- 本试剂盒采用双抗体夹心ELISA法(Sandwich ELISA)检测样品中靶蛋白的浓度，其原理见图2。靶蛋白特异的单克隆捕获抗体已预包被于酶标板上，当加入标准品或样品时，其中的靶蛋白会与捕获抗体结合。当加入辣根过氧化物酶标记靶蛋白抗体后，辣根过氧化物酶标记靶蛋白抗体与靶蛋白结合，形成夹心的免疫复合物。最后加入显色剂TMB溶液，固相捕获的辣根过氧化物酶就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450nm处的吸光度值就能实现定量检测。靶蛋白浓度与A450值呈正比，通过绘制标准曲线，对照样品吸光度值，即可计算出样品中靶蛋白浓度。

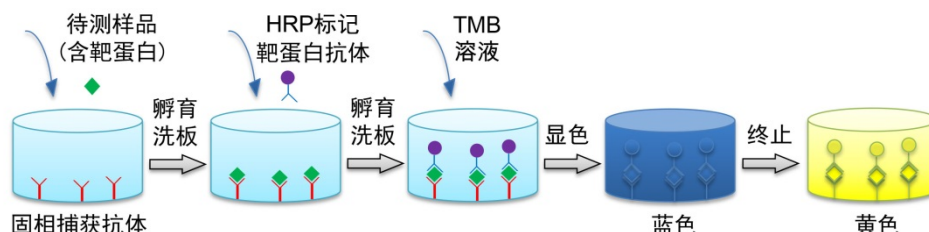


图2. 双抗体夹心ELISA原理图

- 一个包装的本试剂盒，包括标准品检测，可以进行96次检测。

### 包装清单：

产品编号	产品名称	包装
PI602-1	小鼠Insulin抗体预包被板	8孔×12条
PI602-2	标准品稀释液	10ml
PI602-3	小鼠Insulin标准品	2-4瓶
PI602-4	辣根过氧化物酶标记小鼠Insulin抗体	10ml
PI602-5	洗涤液(20X)	30ml
PI602-6	TMB溶液	10ml
PI602-7	终止液	5ml
PI602-8	封板膜(透明)	2张
PI602-9	封板膜(白色)	2张
—	说明书	1份

### 保存条件：

除标准品外，4°C保存6个月内有效。标准品4°C保存，1-2周内有效，-20°C保存6个月内有效。注意TMB溶液避光保存。

### 注意事项：

- 由于标准品一般是冻干粉，在制备后需要严格校准，所以标准品的瓶数及每瓶标准品所需加入的稀释液体积请以实际收到的试剂盒及标准品标签上的标注为准。
- 洗涤液(20X)在低温下可能有结晶，如果发现结晶，请室温水浴加热使结晶完全溶解后再配制工作液。
- 为保证标准品的精确性，标准品配制使用后，如果有剩余请勿再次使用。
- TMB对人体有刺激性，操作时请小心，并注意适当防护以避免直接接触人体或吸入体内。
- 如果发现TMB辣根过氧化物酶显色液出现混浊或颜色变成蓝色，应该停止使用。
- 加样时，请注意每个样品或标准品必须更换枪头，一方面避免交叉污染，另一方面也避免吸取体积的误差。
- 不宜混用不同批号的试剂盒组份，每批次试剂盒均经过独立测试。
- 充分混匀对保证反应结果的精准性很重要，在加液后请轻轻晃动整个96孔板，以保证混匀。
- 本试剂盒很多操作在室温进行，要求严格控制室温在25-28°C。温度低于25°C会导致最终检测到的吸光度显著下降。
- 洗涤过程非常重要，洗涤不充分会使精确度下降并导致结果误差较大。
- 检测标准品和样品时建议设置重复孔，以确保检测结果的可信度。
- 加样过程中须避免气泡的产生。
- 本产品仅限于专业人员的科学研究用，不得用于临床诊断或治疗，不得用于食品或药品，不得存放于普通住宅内。
- 为了您的安全和健康，请穿实验服并戴一次性手套操作。

### 使用说明：

#### 1. 样品准备

- 样品的准备请按下列流程进行操作：

- (a) 细胞上清样品离心取上清即可(如100-500g, 5分钟)。
  - (b) 对于血清样品, 将全血在室温下放置30分钟至2小时, 不要剧烈摇晃以免溶血, 待全血自然凝固并析出血清后, 4°C约1000-2000g离心10分钟, 取黄色上清即得血清, 注意不要吸取白色或淡黄色沉淀。制备好的血清需置于冰上待用。
  - (c) 对于血浆样品, 采集的全血使用肝素或者EDTA进行抗凝处理, 混匀后置冰上, 4°C约1000-2000g离心10分钟, 取黄色或淡黄色上清即得血浆, 注意不要吸取白色沉淀。制备好的血浆需置于冰上待用。
  - (d) 若待测样品不能及时检测, 样品制备后请分装, 冻存于-20°C或-80°C, 并注意避免反复冻融。
- b. 血清样品不应添加任何防腐剂或抗凝剂。
  - c. 样品应清澈透明, 检测前样品中如有悬浮物应通过离心去除。
  - d. 请勿使用溶血、高血脂或污染的样品检测, 否则结果将不准确。

## 2. 检测前准备工作

- a. 试剂盒从冰箱中取出后应置室温(25-28°C)平衡20分钟; 每次检测后剩余试剂请及时置于4°C保存。
- b. 配制适当量的洗涤液: 将洗涤液(20X)用双蒸水或去离子水稀释至1X, 例如10ml洗涤液(20X)加190ml水混匀后即为1X的洗涤液。
- c. 按标准品标签上标注的体积加入标准品稀释液至1瓶标准品中, 室温孵育15分钟(为确保标准曲线的准确性, 切勿缩短孵育时间)。随后轻轻混匀并用移液枪吹打几次使标准品彻底溶解, 使标准品终浓度达到5.5ng/ml。通常每个浓度的标准品需要检测2个孔, 本试剂盒每个孔的标准品用量为10 $\mu$ l, 共需20 $\mu$ l, 同时稀释时还需要使用250 $\mu$ l, 因此如果1瓶标准品配制后的体积不足0.3ml, 请使用更多瓶数的标准品, 并在合并混匀后使用。
- d. 取5个洁净的1.5毫升离心管, 每管预先加入250 $\mu$ l的标准品稀释液, 并参考图3进行标准品的倍比稀释, 最终得到5.5、2.75、1.375、0.687、0.344、0.172ng/ml共六个标准品浓度, 最后将稀释好的标准品依次加入预包被板孔中, 标准品稀释液直接加入作为0ng/ml浓度, 共七个标准品浓度。

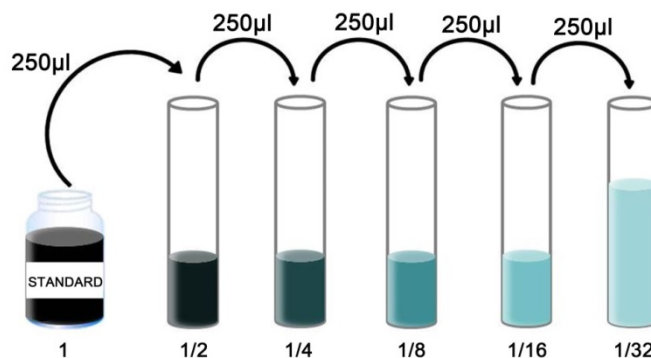


图3. 标准品倍比稀释示意图。按标准品(STANDARD)标签上标注体积加入标准品稀释液溶解并混匀后的浓度为标准品的起始浓度。其它的倍比稀释后的浓度依次为起始浓度的1/2、1/4、1/8、1/16和1/32。

## 3. 洗涤方法

自动洗板机或手工洗板: 每孔洗涤液为300 $\mu$ l, 注入与吸出间隔15-30秒。洗板5次。最后一次洗板完成后将板倒扣在厚吸水纸上适当用力拍干。

## 4. 实验过程需自备的材料和仪器

- a. 不同规格的移液枪及相应的吸头
- b. 酶标仪
- c. 自动洗板机(如果没有也可以手工洗板)
- d. 去离子水或双蒸水

## 5. 操作步骤

- a. 计算并确定一次实验所需的预包被板条数, 取出所需板条放置在96孔框架内, 暂时用不到板条请放回铝箔袋密封, 保存于4°C。
- b. 每次实验都需配制标准品并绘制出标准曲线, 同时建议设置本底校正孔, 即空白孔, 设置方法为该孔只加TMB溶液和终止液。
- c. 分别将样品或不同浓度标准品按照10 $\mu$ l/孔加入相应孔中。如果样品量特别少, 也可以只加入5 $\mu$ l/孔的样品, 但检测结果的可靠性和稳定性会低于10 $\mu$ l/孔的样品。
- d. 按照100 $\mu$ l/孔立刻加入辣根过氧化物酶标记小鼠Insulin抗体。用封板膜(透明)封住反应孔, 室温(25-28°C)孵育120分钟。
- e. 洗板5次, 且最后一次置于厚吸水纸上拍干。
- f. 按照100 $\mu$ l/孔加入显色剂TMB溶液, 用封板膜(白色)封住反应孔, 室温避光孵育10分钟。室温偏低时需要适当延长孵育时间, 此时可以孵育至标准品和样品出现非常显著的颜色变化。
- g. 按照50 $\mu$ l/孔加入终止液, 混匀后立即测量A450值。

## 6. 结果分析

- a. 复孔的值通常在20%的差异范围内结果才有效, 复孔平均值可作为测量值。
- b. 每个标准品或样品的吸光度值应减去本底校正孔的吸光度值(如果没有做校正孔, 则不需要减去)。

- c. 绘制标准曲线。以标准品浓度为横坐标，A450值为纵坐标，以平滑线连接各标准品的坐标点。通过样品的吸光度值和标准曲线计算出样品的相应浓度。

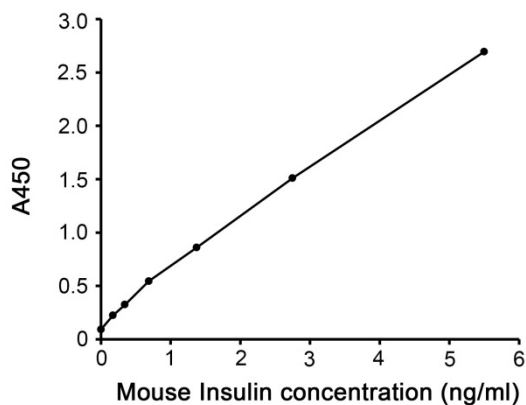


图4. Mouse Insulin ELISA Kit的标准曲线。实测数据会因实验条件、检测仪器等的不同而存在差异，图中数据仅供参考

- d. 若样品OD值高于标准曲线上限，应适当稀释后重新测定，计算浓度时需注意乘以样品的稀释倍数。

**相关产品：**

产品编号	产品名称	包装
PI301	Mouse IL-1 $\beta$ ELISA Kit	96次
PI303	Rat IL-1 $\beta$ ELISA Kit	96次
PI305	Human IL-1 $\beta$ ELISA Kit	96次
PI326	Mouse IL-6 ELISA Kit	96次
PI328	Rat IL-6 ELISA Kit	96次
PI330	Human IL-6 ELISA Kit	96次
PT512	Mouse TNF- $\alpha$ ELISA Kit	96次
PT516	Rat TNF- $\alpha$ ELISA Kit	96次
PT518	Human TNF- $\alpha$ ELISA Kit	96次
PI602	Mouse Insulin ELISA Kit (Ultrasensitive)	96次
PI606	Rat Insulin ELISA Kit (Ultrasensitive)	96次

Version 2016.12.22