

Human Insulin ELISA Kit (Ultrasensitive)

产品编号	产品名称	包装
PI608	Human Insulin ELISA Kit (Ultrasensitive)	96次

产品简介:

- 碧云天的Human Insulin ELISA Kit (Human Insulin Enzyme-Linked ImmunoSorbent Assay Kit), 即人胰岛素酶联免疫吸附检测试剂盒, 是一种用于特异性地高灵敏地定量检测人血清、血浆或细胞培养上清液中的Insulin的ELISA试剂盒。
- 本产品检测灵敏度高, 特异性强, 重复性好。多次重复检测结果表明, 最小检出量为1.54mIU/L, 与人的C肽、Proinsulin、IGF-I、IGF-II和犬胰岛素、小鼠胰岛素等均没有交叉反应, 与猪、绵羊和牛的胰岛素分别有37.4%、48%和31%的交叉反应性。板内、板间变异系数均小于10%。
- 胰岛素(Insulin)是一种肽类激素, 属于Insulin-like蛋白家族, 该家族还包括胰岛素样生长因子(IGFs)、松弛肽和其他Insulin-like多肽。胰岛素主要由胰岛B细胞产生, 主要调控葡萄糖代谢, 维持能量平衡。Insulin分泌异常会导致糖尿病的发生, 糖尿病主要分为两类: 一型糖尿病(T1D, 胰岛素依赖)和二型糖尿病(T2D, 胰岛素非依赖性)。T1D主要是由于胰岛B细胞无法正常分泌胰岛素所导致, 而T2D则是由于胰岛素抵抗所引起。糖尿病的并发症主要包括心脏病、中风、高血压、失明、肾脏疾病和神经病。在美国, 糖尿病已成为了第七大致死疾病。
- 胰岛素体内合成时首先合成含有信号肽的前蛋白质原, 信号肽被剪切后得到86个氨基酸长度的前胰岛素原, 在经过进一步的酶切作用后得到33个氨基酸的B链、21个氨基酸的A链以及34个氨基酸的C链。成熟的人胰岛素是由A链和B链经由二硫键连接所形成的异质二聚体, 与猪胰岛素和犬胰岛素具有99%的氨基酸同源性, 与牛胰岛素具有94%的氨基酸同源性, 与小鼠、大鼠、猫及绵羊的胰岛素具有92%的氨基酸同源性。胰岛素以Zn²⁺结合的六聚体形式储存于胰岛B细胞中, 分泌时以不含Zn²⁺的单体结构分泌至肝门静脉血管中, 以在肝脏中的富集。胰岛素能够持续分泌使浓度维持在一个基础水平, 进食后, 胰岛B细胞将会分泌大量的胰岛素, 控制血糖。
- 胰岛素受体(Ins R)是一种酪氨酸激酶受体, 在所有细胞中都有不同程度的表达。胰岛素通过与两分子受体结合并形成三聚体实现信号传递。受体与胰岛素结合后, 可以增加靶细胞对葡萄糖的摄取。Ins R主要存在两种形式, 同源二聚体和与IGF-I受体形成的异源二聚体。这两种形式的受体都能与胰岛素、IGF-I、IGF-II结合, 只是亲和力有所不同。胰岛素、IGF-I和IGF-II的浓度及细胞表面受体的表达数量均能影响并调控胰岛素信号通路的激活。
- 胰岛素的信号通路较为复杂, 主要是胰岛素与受体结合从而激活PI3K-AKT信号通路。Insulin的信号通路参见图1。

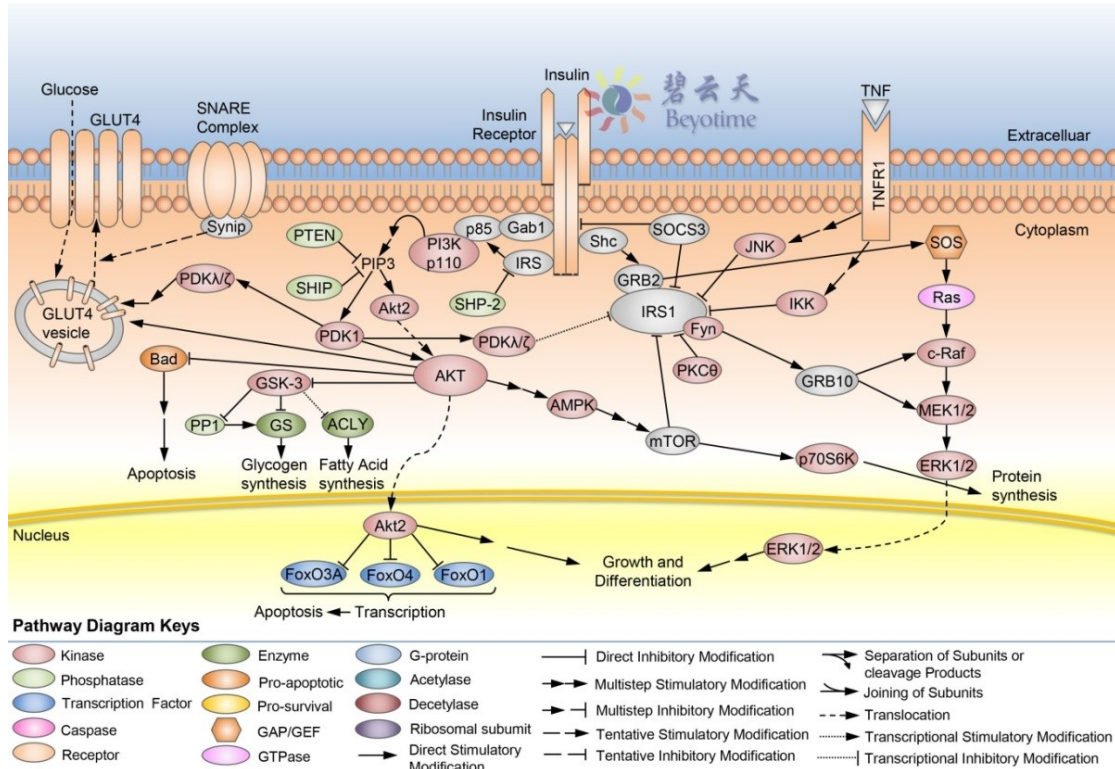


图1. Insulin的信号通路示意图。

- 本试剂盒采用双抗体夹心ELISA法(Sandwich ELISA)检测样品中人Insulin的浓度，其原理见图2。人Insulin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，其中的人Insulin会与捕获抗体结合。当加入辣根过氧化物酶标记人Insulin抗体后，辣根过氧化物酶标记人Insulin抗体与人Insulin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。人Insulin浓度与A450值呈正比，通过绘制标准曲线，对照样品吸光度值，即可计算出样品中人Insulin浓度。

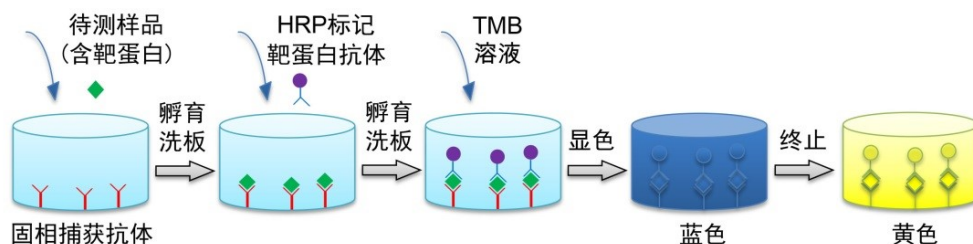


图2. 双抗体夹心ELISA原理图。

- 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
PI608-1	人Insulin抗体预包被板	8孔×12条
PI608-2	标准品稀释液	10ml
PI608-3	人Insulin标准品	2-4瓶
PI608-4	辣根过氧化物酶标记人Insulin抗体	10ml
PI608-5	洗涤液(20X)	30ml
PI608-6	TMB溶液	10ml
PI608-7	终止液	5ml
PI608-8	封板膜(透明)	2张
PI608-9	封板膜(白色)	2张
—	说明书	1份

保存条件：

除标准品外，4℃保存6个月内有效。标准品4℃保存，1-2周内有效，-20℃保存6个月内有效。

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。
- 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确性很重要，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℃。温度低于25℃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

a. 样品的准备请按下列流程进行操作：

- 细胞上清样品离心取上清即可(如100-500g，5分钟)。
- 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℃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。
- 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℃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200mIU/ml。通常每个浓度的标准品需要检测2个孔，每个孔的标准品用量为100μl，共需200μl，同时稀释时还需要使用250μl，因此如果1瓶标准品配制后的体积不足0.45ml，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250μl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200、100、50、25、12.5、6.25mIU/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0mIU/ml浓度，共七个标准品浓度。

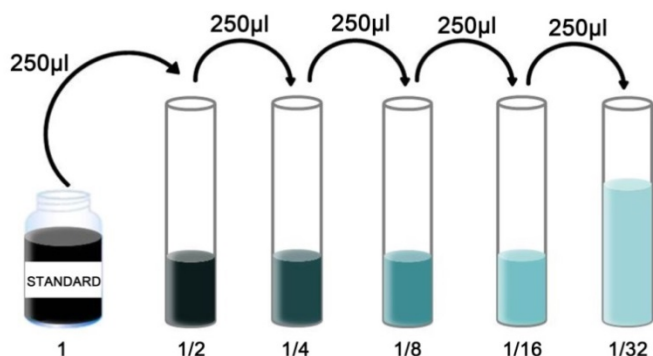


图3. 标准品倍比稀释示意图。按标准品(STANDARD)标签上标注体积加入标准品稀释液溶解并混匀后的浓度为标准品的起始浓度。其它的倍比稀释后的浓度依次为起始浓度的1/2、1/4、1/8、1/16和1/32。

3. 洗涤方法

自动洗板机或手工洗板：每孔洗涤液为300μl，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25μl/孔加入相应孔中。
- d. 按照100μl/孔立刻加入辣根过氧化物酶标记人Insulin抗体。用封板膜(透明)封住反应孔，室温孵育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100μl/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50μl/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。

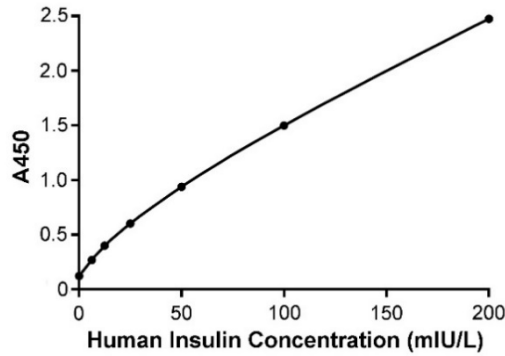


图4. Human Insulin ELISA Kit的标准曲线。实测数据会因实验条件、检测仪器等的不同而存在差异，图中数据仅供参考。

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 β ELISA Kit	96次
PI303	Rat IL-1 β ELISA Kit	96次
PI305	Human IL-1 β 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
PI508	Mouse IFN- γ ELISA Kit	96次
PI510	Rat IFN- γ ELISA Kit	96次
PI511	Human IFN- γ ELISA Kit	96次
PT512	Mouse TNF- α ELISA Kit	96次
PT516	Rat TNF- α ELISA Kit	96次
PT518	Human TNF- α ELISA Kit	96次
PI522	Mouse IL-10 ELISA Kit	96次
PI525	Rat IL-10 ELISA Kit	96次
PI528	Human IL-10 ELISA Kit	96次
PI575	Mouse IL-2 ELISA Kit	96次
PI577	Rat IL-2 ELISA Kit	96次
PI580	Human IL-2 ELISA Kit	96次
PI602	Mouse Insulin ELISA Kit (Ultrasensitive)	96次
PI606	Rat Insulin ELISA Kit (Ultrasensitive)	96次
PI608	Human Insulin ELISA Kit (Ultrasensitive)	96次
PI612	Mouse IL-4 ELISA Kit	96次
PI615	Rat IL-4 ELISA Kit	96次
PI618	Human IL-4 ELISA Kit	96次
PI640	Human IL-8 ELISA Kit	96次

使用本产品的文献：

1. Liu SX,Zheng F,Xie KL,Xie MR,Jiang LJ,Cai Y. Exercise Reduces Insulin Resistance in Type 2 Diabetes Mellitus via Mediating the lncRNA MALAT1/MicroRNA-382-3p/Resistin Axis. MOL THER-NUCL ACIDS. 2019 Dec 6;18:34-44.

Version 2022.08.27