

人胰岛素原(PI)酶联免疫吸附测定试剂盒使用说明书

Human PI ELISA Kit

产品货号: RJ14603

产品规格: 96T/48T

具体保质期请见试剂盒外包装标签。请在保质期内使用试剂盒。

联系时请提供产品批号(见试剂盒标签), 以便我们更高效地为您服务。

Email: renjiebio@163.com 主页: <http://www.rjkit.com>

中国 | 上海仁捷生物科技有限公司

地址: 上海市杨浦区铁岭路 32 号 1519- 10 室

- 该试剂盒用于体外定量检测人 血清、血浆或其他相关生物液体中 PI 的浓度。

PI 简介：

胰岛素原(PI)是胰岛素的前体激素，它是由由胰岛β细胞合成和分泌，主要在肾脏分解代谢。生理情况下，只有极少量的胰岛素原释放入血，在病理情况下，胰岛β细胞释放胰岛素原增多，血中胰岛素原水平升高。它是细胞在裂解成成熟胰岛素之前分泌的最后一个单链蛋白结构。它是由芝加哥大学的 Donald F. Steiner 教授在 1967 年发现的。

实验原理：

本试剂盒采用双抗体夹心法酶联免疫吸附试验(ELISA)。往预先包被有人胰岛素原(PI)捕获抗体的微孔中，依次加入样本、标准品、生物素标记的检测抗体，HRP 酶结合物，中间经过温育和洗涤，用底物 TMB 显色，TMB 在过氧化物酶(HRP)的催化下转化成蓝色，并在酸的作用下转化成最终的黄色。颜色的深浅和样品中的人胰岛素原(PI)呈正相关。用酶标仪在 450nm 波长下测定吸光度(OD 值)，计算样品浓度。

试剂盒组成：

名称	96 孔配置	48 孔配置	备注
预包被 96 孔酶标板 Pre-coated Assay Plate	8 孔×12 条	8 孔×6 条	无
标准品 Standard	2 支	1 支	按说明书进行稀释
通用稀释液 Universal Diluent	2x20mL	1x20mL	无
浓缩生物素化检抗 100× BiPIn-antibody (100×)	120μL	60μL	按说明书进行稀释
浓缩酶结合物 100× Streptavidin-HRP (100×)	120μL	60μL	按说明书进行稀释
20×洗涤液 Wash Buffer (20×)	2x10mL	1x10mL	按说明书进行稀释
底物 (TMB) TMB Substrate	10mL	5mL	无
终止液 Stop Solution	6mL	3mL	无
封板膜 Plate Sealer	4 张	4 张	无
说明书 PItruction Manual	1 份	1 份	无

试剂盒参数：

性能	
灵敏度	4.9 pg/mL
检测范围	12.5-800pg/mL
特异性	可检测样本中人的 PI，且与其类似物无明显交叉反应

需自备的设备及试剂：

1. 450±10nm 滤光片酶标仪
2. 高精度加样器及枪头：0.5-10uL、2-20uL、20-200uL、200-1000uL.
3. Eppendorf 移液器.
4. 蒸馏水或去离子水.
5. 脱脂棉吸水纸.
6. 37℃恒温箱.
8. 准备若干个标准品稀释管.

样本稀释方案：

请提前预估样本的浓度范围，如果您的检测样本需要稀释，参考稀释方案如下：

稀释 100 倍：一步稀释。取 5 μL 样本到 495 μL 通用稀释液内，做 100 倍稀释；

稀释 1000 倍：两步稀释。取 5 μL 样本到 95 μL 通用稀释液内，做 20 倍稀释，再取 5 μL 20 倍稀释样本到 245 μL 通用稀释液内，做 50 倍稀释，总共稀释 1000 倍；

稀释 100000 倍：三步稀释。取 5 μL 样本到 195 μL 通用稀释液内，做 40 倍稀释，再取 5 μL 40 倍稀释样本到 245 μL 通用稀释液内，做 50 倍稀释，最后取 5 μL 2000 倍稀释样本到 245 μL 通用稀释液内，做 50 倍稀释，总共稀释 100000 倍；

每步稀释时取液量不少于 3 μL，稀释倍数不超过 100 倍。每步稀释都需混合均匀，避免起泡。

样本处理及要求：

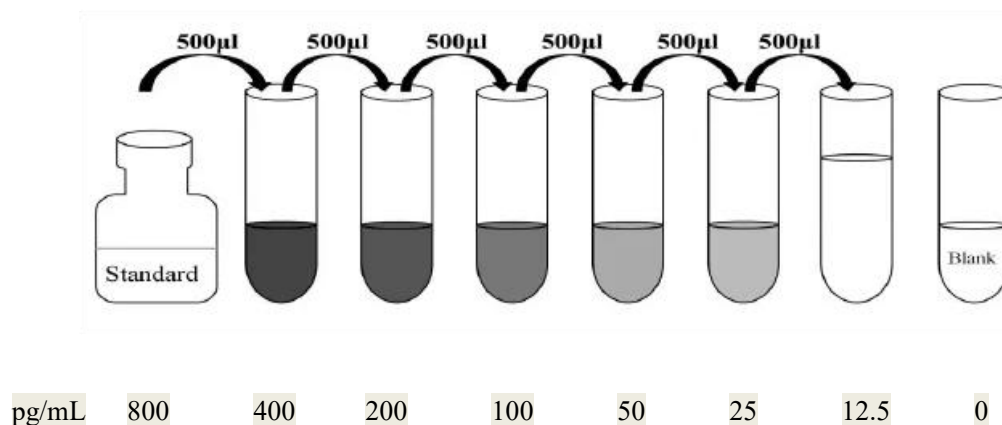
1. **血清：**将收集于血清分离管的全血标本在室温放置 2 小时或 4℃ 过夜，然后 1000×g 离心 20 分钟，取上清即可，或将上清置于-20℃或-80℃保存，但应避免反复冻融。
2. **血浆：**用 EDTA 或肝素作为抗凝剂采集标本，并将标本在采集后的 30 分钟内于 2-8℃ 1000×g 离心 15 分钟，取上清即可检测，或将上清置于-20℃或-80℃保存，但应避免反复冻融。
3. **组织匀浆：**用预冷的 PBS (0.01M, pH=7.4) 冲洗组织，去除残留血液（匀浆中裂解的红细胞会影响测量结果），称重后将组织剪碎。将剪碎的组织与对应体积的 PBS（一般按 1:9 的重量体积比，比如 1g 的组织样品对应 9mL 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）加入玻璃匀浆器中，于冰上充分研磨。为了进一步裂解组织细胞，可以对匀浆液进行超声破碎，或反复冻融。最后将匀浆液于 5000×g 离心 5~10 分钟，取上清检测。
4. **细胞培养物上清：**请 1000×g 离心 20 分钟，取上清即可检测，或将上清置于-20℃或-80℃保存，但应避免反复冻融。
5. 其它生物标本：1000×g 离心 20 分钟，取上清即可检测。
6. **样品外观：**样品应清澈透明，悬浮物应离心去除。
7. **样品保存：**样品收集后若在 1 周内进行检测的可保存于 4℃，若不能及时检测，请按一次使用量分装，冻存于-20℃（1 个月内检测），或-80℃（6 个月内检测），避免反复冻融，标本溶血会影响最后检测结果，因此溶血标本不宜进行此项检测。

检测前准备工作：

1. 请提前 10 分钟从冰箱中取出试剂盒，平衡至室温。

标准品梯度工作液配制：加入 1mL 通用稀释液至冻干标准品中，静置 15 分钟待其完全溶解后轻轻混匀（浓度为 800pg/mL），然后按照以下浓度：800pg/mL、400pg/mL、200pg/mL、100pg/mL、50pg/mL、25pg/mL、12.5pg/mL、0pg/mL 进行稀释。

倍比稀释方法：取 7 支 EP 管，每管中加入 500 μL 通用稀释液，200pg/mL 的标准品工作液中吸取 500 μL 到第一支 EP 管中混匀配成 100pg/mL 的标准品工作液，按此步骤往后依次吸取混匀。最后一管直接作为空白孔，不需要再从倒数第二管中吸取液体，具体如下图。



1. **生物素化抗工作液配制**: 使用前 15 分钟将浓缩生物素化抗体于 $1000\times g$ 离心 1 分钟, 以通用稀释液将 $100\times$ 浓缩生物素化抗体稀释成 $1\times$ 工作浓度 (例: $10\ \mu\text{L}$ 浓缩液+ $990\ \mu\text{L}$ 通用稀释液), 当日使用。
2. **酶结合物工作液配制**: 使用前 15 分钟将 $100\times$ 浓缩酶结合物于 $1000\times g$ 离心 1 分钟, 以通用稀释液将 $100\times$ 浓缩 HRP 酶结合物稀释成 $1\times$ 工作浓度 (例: $10\ \mu\text{L}$ 浓缩液+ $990\ \mu\text{L}$ 通用稀释液), 当日使用。
3. **$1\times$ 洗涤液配制**: 取 10ml $20\times$ 洗涤液到 190ml 蒸馏水中 (从冰箱中取出的浓缩洗涤液可能有结晶, 属于正常现象, 可放置室温, 轻摇均匀, 待结晶完全溶解后再配置)。

操作步骤 :

1. 从室温平衡 10 分钟后的铝箔袋中取出所需板条, 剩余板条用自封袋密封放回 4°C 。
2. 加样: 分别将样品或不同浓度标准品按照 $100\ \mu\text{L}$ 每孔加入相应孔中, 空白孔加入 $100\ \mu\text{L}$ 通用稀释液。盖上封板膜后 37°C 温育 1 小时。(建议: 将待测样本用通用稀释液最低稀释 1 倍后再加入酶标板内测试。从而减少基质效应对测试结果的误差影响, 最后计算样本浓度时需乘以对应的稀释倍数。所有的待测样本和标准品在检测中建议设立复孔)。
3. 加生物素化抗体: 取出酶标板, 弃去液体, 不用洗涤。每孔直接加入生物素化抗体工作液 $100\ \mu\text{L}$, 盖上封板膜后 37°C 温育 1 小时。
4. 洗板: 弃去液体, 每孔加入 $300\ \mu\text{L}$ $1\times$ 洗涤液, 静置 1 分钟, 甩去洗涤液, 吸水纸上拍干, 如此重复洗板 3 次 (也可用洗板机洗板)。
5. 加酶结合物工作液: 每孔加入酶结合物工作液 $100\ \mu\text{L}$, 盖上封板膜后 37°C 温育 30 分钟。
6. 洗板: 弃去液体按步骤 4 洗涤方法, 洗板 5 次。
7. 加底物: 每孔加入底物(TMB) $90\ \mu\text{L}$, 盖上封板膜, 37°C 避光温育 15 分钟。
8. 加终止液: 取出酶标板, 每孔直接加入终止液 $50\ \mu\text{L}$, 立即在 450nm 波长处测定各孔的 OD 值。

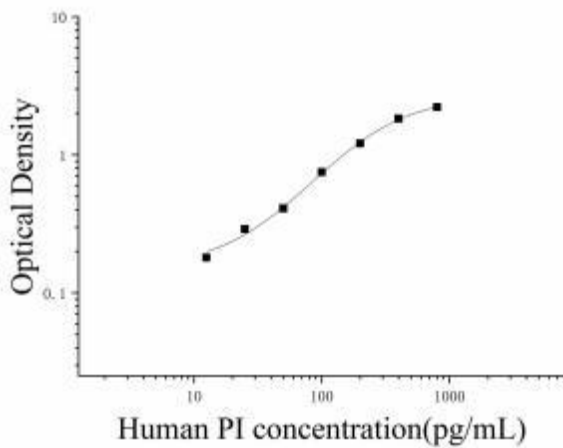
结果判断：

1. 计算标准品和样本复孔的平均 OD 值并减去空白孔的 OD 值作为校正值。以浓度为横坐标，OD 值为纵坐标，在双对数坐标纸上绘出四参数逻辑函数的标准曲线(作图时去掉空白组的值)。
2. 若样品 OD 值高于标准曲线上限，应当稀释后重测并在计算样本浓度时乘以相应的稀释倍数。

典型数据和参考曲线：

以下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。

浓度 (pg/mL)	800	400	200	100	50	25	12.5	0
OD 值	2.32	1.93	1.31	0.85	0.51	0.39	0.28	0.1
校正 OD 值	2.22	1.83	1.21	0.75	0.41	0.29	0.18	-



注意：本图仅供参考，应以同次试验标准品所绘标准曲线计算标本含量。

试剂盒性能：

1. 重复性：板内变异系数小于 10%，板间变异系数小于 10%。
2. 回收率：在选取的健康人血清、血浆和组织匀浆中加入 3 个不同浓度水平的人 PI，计算回收率

样本类型	范围	平均回收率
血清 (n=8)	84-101	96
血浆(n=8)	92-105	102
细胞培养上清(n=8)	96-108	105

3. 线性稀释：分别在选取的 4 份健康人血清、血浆和组织匀浆中加入高浓度人 PI，在标准曲线动力学范围内进行稀释，评估线性。评估线性。

稀释比例	回收率 (%)	血清	血浆	细胞培养上清
1: 2	范围 (%)	84-95	88-96	90-110
	平均回收率 (%)	91	93	96
1: 4	范围 (%)	89-103	87-108	105-115
	平均回收率 (%)	94	98	109

注意事项：

1. 严格按照规定的时间和温度进行温育以保证准确结果。所有试剂都必须在使用前达到室温 20-25℃。使用后应立即冷藏保存试剂。
2. 洗板不正确会导致不准确的结果。在加入底物前确保尽量吸干孔内液体。温育过程中不要让微孔干燥掉。
3. 消除板底残留的液体和手指印，否则影响 OD 值。
4. 底物显色液应呈无色或很浅的颜色，已经变蓝的底物液不能使用。
5. 避免试剂和标本的交叉污染以免造成错误结果。
6. 在储存和温育时避免强光直接照射。
7. 平衡至室温后再打开密封袋以防水滴凝聚在冷板条上。
8. 任何反应试剂不能接触漂白溶剂或漂白溶剂所散发的强烈气体。任何漂白成分都会破坏试剂盒中反应试剂的生物活性。
9. 不能使用过期产品。
10. 如果可能传播疾病，所有的样品都应管理好，按照规定的程序处理样品和检测装置。