

大鼠胰高糖素肽（Glp-1）酶联免疫分析试剂盒使用说明书

本试剂盒仅供体外研究使用！

预期应用

ELISA 法定量测定大鼠血清、血浆、细胞培养上清或其它相关生物液体中胰高糖素肽（Glp-1）含量。

实验原理

用纯化的抗体包被微孔板，制成固相载体，往包被抗 Glp-1 抗体的微孔中依次加入标本或标准品、生物素化的抗 Glp-1 抗体、HRP 标记的亲合素，经过彻底洗涤后用底物 TMB 显色。TMB 在过氧化物酶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 Glp-1 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。

试剂盒组成及试剂配制

1. 酶联板：一块（96 孔）
2. 标准品（冻干品）：2 瓶，每瓶临用前以样品稀释液稀释至 1ml，盖好后静置 10 分钟以上，然后反复颠倒/搓动以助溶解，其浓度为 100 pmol/l，做系列倍比稀释（注：不要直接在板中进行倍比稀释）后，分别稀释成 100 pmol/l, 50 pmol/l, 25 pmol/l, 12.5 pmol/l, 6.25 pmol/l, 3.12 pmol/l, 1.56 pmol/l，样品稀释液直接作为标准浓度 0 pmol/l，临用前 15 分钟内配制。
如配制 50 pmol/l 标准品：取 0.5ml（不要少于 0.5ml）100 pmol/l 的上述标准品加入含有 0.5ml 样品稀释液的 Eppendorf 管中，混匀即可，其余浓度以此类推。
3. 样品稀释液：1×20ml。
4. 检测稀释液 A：1×10ml。
5. 检测稀释液 B：1×10ml。
6. 检测溶液 A：1×120μl（1:100）临用前以检测稀释液 A 1:100 稀释，稀释前根据预先计算

好的每次实验所需的总量配制（100 μ l/孔），实际配制时应多配制 0.1-0.2ml。如 10 μ l 检测溶液 A 加 990 μ l 检测稀释液 A 的比例配制，轻轻混匀，在使用前一小时内配制。

7. 检测溶液 B：1 $\times$ 120 μ l/瓶（1:100）临用前以检测稀释液 B 1:100 稀释。稀释方法同检测溶液 A。

8. 底物溶液：1 $\times$ 10ml/瓶。

9. 浓洗涤液：1 $\times$ 30ml/瓶，使用时每瓶用蒸馏水稀释 25 倍。

10. 终止液：1 $\times$ 10ml/瓶（2N H₂SO₄）。

11. 覆膜：5 张

12. 使用说明书：1 份

自备物品

1. 酶标仪（建议参考仪器使用说明提前预热）

2. 微量加液器及吸头，EP 管

3. 蒸馏水或去离子水，全新滤纸

标本的采集及保存

1. 血清：全血标本请于室温放置 2 小时或 4℃过夜后于 1000 x g 离心 20 分钟，取上清即可检测，或将标本放于-20℃或-80℃保存，但应避免反复冻融。

2. 血浆：可用 EDTA 或肝素作为抗凝剂，标本采集后 30 分钟内于 2 - 8° C 1000 x g 离心 15 分钟，或将标本放于-20℃或-80℃保存，但应避免反复冻融。

3. 细胞培养物上清或其它生物标本：请 1000 x g 离心 20 分钟，取上清即可检测，或将标本放于-20℃或-80℃保存，但应避免反复冻融。

注：以上标本置 4℃保存应小于 1 周，-20℃或-80℃均应密封保存，-20℃不应超过 1 个月，-80℃不应超过 2 个月；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。

操作步骤

实验开始前，各试剂均应平衡至室温（试剂不能直接在 37℃ 溶解）；试剂或样品稀释时，均需混匀，混匀时尽量避免起泡。实验前应预测样品含量，如样品浓度过高时，应对样品进行稀释，以使稀释后的样品符合试剂盒的检测范围，计算时再乘以相应的稀释倍数。

1. 加样：分别设空白孔、标准孔、待测样品孔。空白孔加样品稀释液 100μl，余孔分别加标准品或待测样品 100μl，注意不要有气泡，加样将样品加于酶标板孔底部，尽量不触及孔壁，轻轻晃动混匀，酶标板加上盖或覆膜，37℃ 反应 120 分钟。为保证实验结果有效性，每次实验请使用新的标准品溶液。

2. 弃去液体，甩干，不用洗涤。每孔加检测溶液 A 工作液 100μl（在使用前一小时内配制），酶标板加上覆膜，37℃ 反应 60 分钟。

3. 温育 60 分钟后，弃去孔内液体，甩干，洗板 3 次，每次浸泡 1-2 分钟，大约 400μl/每孔，甩干（也可轻拍将孔内液体拍干）。

4. 每孔加检测溶液 B 工作液（同检测 A 工作液）100μl，酶标板加上覆膜 37℃ 反应 60 分钟。

5. 温育 60 分钟后，弃去孔内液体，甩干，洗板 5 次，每次浸泡 1-2 分钟，350μl/每孔，甩干（也可轻拍将孔内液体拍干）。

6. 依序每孔加底物溶液 90μl，酶标板加上覆膜 37℃ 避光显色（30 分钟内，此时肉眼可见标准品的前 3-4 孔有明显的梯度兰色，后 3-4 孔梯度不明显，即可终止）。

7. 依序每孔加终止溶液 50μl，终止反应，此时蓝色立转黄色。终止液的加入顺序应尽量与底物液的加入顺序相同。为了保证实验结果的准确性，底物反应时间到后应尽快加入终止液。

8. 用酶联仪在 450nm 波长依序测量各孔的光密度（OD 值）。在加终止液后立即进行检测。

注：

1. 试剂准备：所有试剂都必须在使用前达到室温，使用后请立即按照说明书要求保存试剂。

实验操作中请使用一次性的吸头，避免交叉污染。

2. 加样：加样或加试剂时，请注意在吸取标本 / 标准品，酶结合物或底物时，第一个孔与

最后一个孔加样之间的时间间隔如果太大，将会导致不同的“预孵育”时间，从而明显地影响到测量值的准确性及重复性。一次加样时间（包括标准品及所有样品）最好控制在 10 分钟内，如标本数量多，推荐使用多道移液器加样。

3. 孵育：为防止样品蒸发，试验时将反应板放于铺有湿布的密闭盒内，酶标板加上盖或覆膜，以避免液体蒸发；洗板后应尽快进行下步操作，任何时候都应避免酶标板处于干燥状态；同时应严格遵守给定的孵育时间和温度。

4. 洗涤：洗涤过程中反应孔中残留的洗涤液应在滤纸上充分拍干，勿将滤纸直接放入反应孔中吸水，同时要消除板底残留的液体和手指印，避免影响最后的酶标仪读数。

5. 试剂配制：Detection A 及 Detection B 在使用前请手甩几下或少时离心处理，以使管壁或瓶盖的液体沉积到管底。标准品、检测溶液 A 工作液、检测溶液 B 工作液请依据所需的量配置使用，并使用相应的稀释液配制，不能混淆。请精确配置标准品及工作液，尽量不要微量配置（如吸取检测溶液 A 时，一次不要小于 10 μ l），以避免由于不准确稀释而造成的浓度误差；请勿重复使用已稀释过的标准品、检测溶液 A 工作液或检测溶液 B 工作液。

6. 反应时间的控制：加入底物后请定时观察反应孔的颜色变化（比如，每隔 10 分钟），如颜色较深，请提前加入终止液终止反应，避免反应过强从而影响酶标仪光密度读数。

7. 底物：底物请避光保存，在储存和温育时避免强光直接照射。

建议检测样品时均设双孔测定，以保证检测结果的准确性。

如标本中待测物质含量过高，请先稀释后再测定，计算时请最后乘以稀释倍数。

洗板方法

1. 手工洗板方法：吸去（不可触及板壁）或甩掉酶标板内的液体；在实验台上铺垫几层吸水纸，酶标板朝下用力拍几次；将推荐的洗涤缓冲液至少 0.3ml 注入孔内，浸泡 1-2 分钟，根据需要，重复此过程数次。

2. 自动洗板：如果有自动洗板机，应在熟练使用后再用到正式实验过程中。

特异性

本试剂盒可同时检测重组或天然的大鼠 Glp-1，且与其它相关蛋白无交叉反应。

计算

以标准物的浓度为纵坐标（对数坐标），OD 值为横坐标（对数坐标），在对数坐标纸上绘出标准曲线。推荐使用专业制作曲线软件进行分析，如 curve expert 1.3，根据样品的 OD 值由标准曲线查出相应的浓度，再乘以稀释倍数；或用标准物的浓度与 OD 值计算出标准曲线的回归方程式，将样品的 OD 值代入方程式，计算出样品浓度，再乘以稀释倍数，即为样品的实际浓度。

检测范围：1.56 pmol/l - 100 pmol/l

最低检测限：0.78 pmol/l

说明

1. 在储存及孵育过程中避免将试剂暴露在强光中。所有试剂瓶盖须盖紧以防止蒸发和污染，试剂避免受到微生物的污染，因为蛋白水解酶的干扰将导致出现错误的结果。
2. 小心吸取试剂并严格遵守给定的孵育时间和温度。请注意在吸取标本 / 标准品，酶结合物或底物时，第一个孔与最后一个孔加样之间的时间间隔如果太大，将会导致不同的“预孵育”时间，从而明显地影响到测量值的准确性及重复性。而且，洗涤不充分将影响试验结果。
3. 试剂盒保存：部分试剂保存于 -20℃，部分试剂保存于 2-8℃，具体以标签上的标示为准。
4. 浓洗涤液会有盐析出，稀释时可在水浴中加温助溶。
5. 刚开启的酶联板孔中可能会含有少许水样物质，此为正常现象，不会对实验结果造成任何影响。
6. 中、英文说明书可能会有不一致之处，请以英文说明书为准。
7. 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。
8. 有效期：6 个月