文件编号： SOP	修订编号：	起效日：		页码：1/4
文件名：高纯度人胰岛糖刺激试验操作				

高纯度人胰岛糖刺激试验操作

一、溶液的配制：Kreb 氏液，含 Hepes，再加一些缓冲盐离子，配制结束后 0.22 μm 过滤，调 pH 值，作为糖刺激时的稀释液，可提前配制，4℃冰箱保存两周；高糖溶液为葡萄糖溶解到 Kreb 氏液中，先配制高浓度的高糖溶液：280 mM，称取 2.5 g D-(+)-Glucose（分子量 180），用 Krebs Buffer50 ml 稀释(用 50 ml 离心管，算起来正好是 278 mM)(溶液的配制见：**人胰岛糖刺激试验测定胰岛素释放指数时的 krebs Buffer stock solution 和高糖低糖溶液的配制 SOP**)；然后用之前取 1 ml280 mM 溶液，加 Kreb 氏液 9 ml 稀释（用 15 ml 离心管），得到的溶液浓度为：高糖：28 mM；取高糖：28 mM 1.5 ml，加 Kreb 氏液稀释至 15 ml（用 15 ml 离心管），得到溶液为低糖：2.8 mM。

二、糖刺激试验：

（1）取一个 24 孔板，只用左边四排的 A，B，C 三孔，A1，A2，A3，B1，B2，B3，C1，C2，C3，都加入低糖 Kreb 氏液，D1，D2，D3 加入的是高糖的 Kreb 氏液（溶液的添加见下表）；其中 A，B 每孔加入 1 ml 溶液，C，D 每孔加 1.3 ml；往 A4，A5，A6 三孔中各放入一个直径 12 mm，孔径 12 μm 的筛网（Insert，millicell 公司），放置于 37℃培养箱中培养 1 h，作为平衡。

（2）在这平衡的 1 h 中，吸取约 400 IEQ 胰岛，至 1.5 mlEP 管中，等胰岛沉淀后，用宽口的移液枪头分两次每次 200 μl 吸取底部的胰岛，放到另一个 1.5 mlEP 管中；

（3）用宽口的移液枪取三份人的胰岛（每份 100 μl 约 100IEQ），添加到 A4，A5，A6 三孔中的筛网（Insert）内，用无菌棉布擦过的镊子提起筛网，用无菌纱布吸干筛网下的溶液，再将筛网及连同刚才装里面的胰岛分别装到 A1，A2，A3 三个孔中，用低葡萄糖浓度的溶液清洗一遍胰岛；取出筛网及胰岛，用无菌纱布吸干溶液，再分别装到 B1，B2，B3 三个孔中，放置于 37 度 5%CO2 培养 1 h，作为复温和过渡；

（4）1 h 后用酒精棉擦过的镊子取出筛网，用消毒纱布吸干培养液，底部用无菌纱布吸干溶液，将筛网和胰岛放至 C1，C2，C3 开始进行低糖刺激，迅速移取 C1，C2，C3 中的溶液 0.3 ml 至 1.5 mlEP 管中，作为低糖刺激 0 时间的样本；再同时把 B1，B2，B3 的溶液要分别装到 1.5 ml 的 EP 管中作为基线对照，一周内测定可放到 4℃冰箱中，一个月内测定需放到-20℃保存；

（5）37℃5%CO2 孵育 1 h，取出筛网和胰岛，注意用无菌镊子将筛网的底要轻轻触碰孔板中对应的培养孔，使筛网中的胰岛素溶液尽量流到培养孔中，因为筛网中的溶液中胰岛素含量可能会相对较高；一次性消毒纱布吸干培养液，放至 D1，D2，D3 高糖溶液中继续孵育，同时迅速移取 D1，D2，D3 中的溶液 0.3 ml 至 1.5 mlEP 管中，作为高糖刺激 0 时间的样本；

（6）把低糖刺激后的溶液全部取出，至 1.5 mlEP 管中，标记 LC1，LC2，LC3，-20℃长期保存或 4℃作短暂保存；高糖刺激孵育 1 h 后取出胰岛及筛网，弃去；将高糖刺激后的溶液全部取出至 1.5 mlEP 管中，标记 HD1，HD2，HD3，-20℃长期保存或 4℃作短暂保存；用 Elisa 法测定胰岛素浓度，计算刺激因子。

文件编号： SOP	修订编号：	起效日：		页码：2/4
文件名：高纯度人胰岛糖刺激试验操作				

糖刺激溶液安排表：

	1	2	3	4	5	6
A	L1.0 ml	L1.0 ml	L1.0 ml	Insert	Insert	Insert
B	L1.0 ml	L1.0 ml	L1.0 ml			
C	L1.3 ml	L1.3 ml	L1.3 ml			
D	H1.3 ml	H1.3 ml	H1.3 ml			

以上步骤为人胰岛细胞静态糖刺激后胰岛素释放试验操作过程。

操作员：_____ 日期：_____

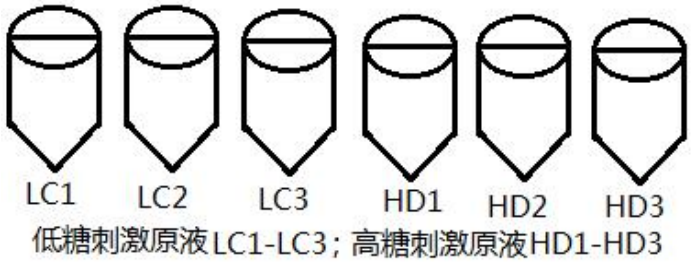
复核员：_____ 日期：_____

附件：

人胰岛素样品的酶免 Elisa 方法测定（该测定可委托医院检验科协助操作）：

测定步骤如下（胰岛素标准品及相关检测试剂购买之瑞典 Uppsala 大学）：

1，先用 PBS 将低糖刺激和高糖刺激样品稀释成三份，分别为：1：1 稀释，1：3 稀释和 1：5 稀释，方法为 50 µl 低糖刺激液，加 50 µlPBS；50 µl 低糖刺激液，加 150 µlPBS；50 µl 低糖刺激液，加 250 µlPBS；因为低糖刺激和高糖刺激的样品分别有三份，即 LC1，LC2，LC3 和 HD1，HD2，HD3，所以稀释到 1.5 ml 的 EP 管后，样品总共有 18 个。



LC11;LC13;LC15 HD11;HD13;HD15

LC21;LC23;LC25 HD21;HD23;HD25

LC31;LC33;LC35 HD31;HD33;HD35

低糖刺激稀释样品 高糖刺激稀释样品

取胰岛素测定的 96 孔板（已经包被了抗原），分别加入各 50 µl 样品：A1，A2，A3 为标准曲线样品 0，B1，B2，B3 为标准曲线样品 1， C1，C2，C3 为标准曲线样品 2，D1，D2，D3 为标准曲线样品 3，E1，E2，E3 为标准曲线样品 4，F1，F2，F3 为标准曲线样品 5，G1，G2，G3 为低浓度的标准对照样品(Control L)，H1，H2，H3 为高浓度的标准对照样品(Control H)；这些样品孔是拿来做标准曲线的。

文件编号： SOP	修订编号：	起效日：		页码：3/4
文件名：高纯度人胰岛糖刺激试验操作				

以下是 96 孔样品编排：

	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12
A	标 0	标 0	标 0	LC11	LC11	LC11	LC13	LC13	LC13	LC15	LC15	LC15
B	标 1	标 1	标 1	HD11	HD11	HD11	HD13	HD13	HD13	HD15	HD15	HD15
C	标 2	标 2	标 2	LC21	LC21	LC21	LC23	LC23	LC23	LC25	LC25	LC25
D	标 3	标 3	标 3	HD21	HD21	HD21	HD23	HD23	HD23	HD25	HD25	HD25
E	标 4	标 4	标 4	LC31	LC31	LC31	LC33	LC33	LC33	LC35	LC35	LC35
F	标 5	标 5	标 5	HD31	HD31	HD31	HD33	HD33	HD33	HD35	HD35	HD35
G	CtlL	CtlL	CtlL	LC1	LC1	LC1	LC2	LC2	LC2	LC3	LC3	LC3
H	CtlH	CtlH	CtlH	HD1	HD1	HD1	HD2	HD2	HD2	HD3	HD3	HD3

注：A4，A5，A6 为低糖刺激 LC1 样品 1：1 稀释，A7，A8，A9 为低糖刺激 LC1 样品 1：3 稀释，A10，A11，A12 为低糖刺激 LC1 样品 1：5 稀释；

B4，B5，B6 为高糖刺激 HD1 样品 1：1 稀释，B7，B8，B9 为高糖刺激 HD1 样品 1：3 稀释，B10，B11，B12 为高糖刺激 HD1 样品 1：5 稀释；

C4，C5，C6 为低糖刺激 LC2 样品 1：1 稀释，C7，C8，C9 为低糖刺激 LC2 样品 1：3 稀释，C10，C11，C12 为低糖刺激 LC2 样品 1：5 稀释；

D4，D5，D6 为高糖刺激 HD2 样品 1：1 稀释，D7，D8，D9 为高糖刺激 HD2 样品 1：3 稀释，D10，D11，D12 为高糖刺激 HD2 样品 1：5 稀释；

E4，E5，E6 为低糖刺激 LC3 样品 1：1 稀释，E7，E8，E9 为低糖刺激 LC3 样品 1：3 稀释，E10，E11，E12 为低糖刺激 LC3 样品 1：5 稀释；

F4，F5，F6 为高糖刺激 HD3 样品 1：1 稀释，F7，F8，F9 为高糖刺激 HD3 样品 1：3 稀释，F10，F11，F12 为高糖刺激 HD3 样品 1：5 稀释；

G4，G5，G6 为低糖刺激 LC1 原液未稀释样品，G7，G8，G9 为低糖刺激 LC2 原液未稀释样品，G10，G11，G12 为低糖刺激 LC3 原液未稀释样品；

H4，H5，H6 为高糖刺激 HD1 原液未稀释样品，H7，H8，H9 为高糖刺激 HD2 原液未稀释样品，H10，H11，H12 为高糖刺激 HD3 原液未稀释样品。

下面正式处理样品：

（1）样品添加完后，加入第一个酶交联剂 Enzyme Conjugate（该酶交联剂原液为 11×，使用前用蓝色的 Enzyme Conjugate Buffer 溶液稀释 11 倍，即 1 ml 原液加 10 mlBuffer），用 12 孔排枪加，每孔加 100 µl；排枪的枪头如果碰到了胰岛素释放样品，则要全部换掉，如果没有碰到胰岛素样品，则可以继续重复取液；添加完蓝色的酶交联液后用锡箔纸盖住 96 孔板，在室温下振荡 45-60 min（在此期间配置洗涤液，一般可以 60 min，室温下放置也行）；

（2）倒掉其中的样品和酶交联剂溶液，用稀释 20 倍的洗涤液洗涤 6 次（洗涤液原液是 wash buffer 21×，取 20 ml 洗涤液原液加到含有 350 ml 蒸馏水的量筒中，然后再用蒸馏水定容到 400 ml，其实只用到不到 200 ml，有 200 ml 是浪费的），每次为 12 孔排枪加，每孔加 250 µl，加完后再稍静置，然后就倒掉，再继续加洗涤液（或把洗涤液装到水瓶中，用水瓶冲洗 96 孔板）；洗涤完 6 次后，最后一次要把孔板倒扣到白纸上拍干；

文件编号： SOP	修订编号：	起效日：		页码：4/4
文件名：高纯度人胰岛糖刺激试验操作				

（3）用 12 孔排枪加入第二个溶液：Substrate TMB，在室温下震摇 15 min（用锡箔纸覆盖），直接加入 Stop solution，用 12 孔排枪加，每孔 50μl，用排枪混匀（混匀很要紧，每次混匀后要换枪头），此时 96 孔板中的溶液就显示了黄色，直接放到 Elisa 机器中去读数。

（4）点击电脑上的图标：KC-Junior，选择第一个按钮，输入样品编号，如：ICRH 49，在 450 nm 下进行测定，点击读数。

数据的处理：先是显示标准曲线，浓度和吸光度的关系一般都是很直的；然后低糖刺激和高糖刺激的样品稀释液看其吸光度的范围是不是在标准曲线内，这次结果发现我们的稀释液中胰岛素浓度还是较高，可能要稀释 10 倍差不多，可能是燕平她说高糖刺激的时间长了点，所以胰岛素释放的比较多，我们勉强把 1：5 稀释的三对样品取出来，数据考到新的 EXCEL 上.

A10，A11，A12 为低糖刺激 LC1 样品 1：5 稀释；

B10，B11，B12 为高糖刺激 HD1 样品 1：5 稀释；

C10，C11，C12 为低糖刺激 LC2 样品 1：5 稀释；

D10，D11，D12 为高糖刺激 HD2 样品 1：5 稀释；

E10，E11，E12 为低糖刺激 LC3 样品 1：5 稀释；

F10，F11，F12 为高糖刺激 HD3 样品 1：5 稀释；

每组样品均要平均一下，然后计算刺激指数：SI1=Bmean/Amean，SI2=Dmean/Cmean，SI3=Fmean/Emean，最后的计算结果是本次实验的胰岛细胞糖刺激胰岛素释放指数 SI=（SI1+SI2+SI3）/3。

操作员：_____ 日期：_____

复核员：_____ 日期：_____