



小鼠代谢相关检测技术手册

北京吉康医学科技有限公司

www.genecome.cn



目录

1.葡萄糖耐受实验(GTT)	2
2.胰岛素耐受实验(ITT)	4
3.丙酮酸耐受实验(Pyruvate challenge test)	6
4.小鼠血清胰岛素的测定(ELISA)	8
5.小鼠机体脂肪含量分析(DEXA 检测)	11
6.小鼠胰岛的分离纯化	13
7.分离胰岛的胰岛素分泌(GSIS)	15
8.小鼠的灌流	17
9.小鼠胰腺的组织学分析—石蜡包埋	19
10.小鼠胰腺的组织学分析—胰腺的连续切片	21
11.小鼠胰腺的组织学分析—HE 染色	23
12.小鼠的日基础摄食量检测	25
13.小鼠的体温的检测	27
14.小鼠血浆活性胰高血糖素样肽 1(GLP-1)的测定(ELISA)	28
15.小鼠血清胃抑制性多肽(GIP)的测定(ELISA)	31
16.小鼠血清胰高血糖素(Glucagon)的检测(ELISA)	34



1.葡萄糖耐受实验(GTT)

试剂和仪器:

葡萄糖(Cat: G6125, Sigma-Aldrich), 生理盐水(0.85% NaCl), 血糖仪(GLUCOCARD II Series Test Meter, ARKRAY)和血糖试纸(GLUCOCARD Test Strip II, ARKRAY)。

注意事项:

小鼠葡萄糖耐受实验的葡萄糖使用量一般为 1.5 g 或者 2 g 每公斤体重(1.5 or 2 g/kg), 根据具体的实验要求配置合适的浓度的葡萄糖溶液。如葡萄糖使用量是 2 g/kg, 则用生理盐水(saline)配置 20%的葡萄糖溶液。

操作步骤:

1. 小鼠准备: 每组实验(如不同基因型或给药组)小鼠数量不得少于 6 只, 对照组必须是 同年龄、同性别的小鼠。于实验前一天下午 5 点将小鼠换入干净的笼子禁食, 禁食 16 小时, 至次日上午 9 点。禁食期间, 小鼠保持正常的饮水;
2. 次日上午九点, 开始葡萄糖耐受实验。称取每只小鼠的体重, 并用标记笔在小鼠尾巴的根部标记序号, 以便在实验过程中能快速的辨认所测小鼠;
3. 空腹基础血糖的测定: 将小鼠从笼子中取出, 轻放于铁网格之上, 用剪刀剪去小鼠尾巴末端约 1-2 mm, 轻轻挤压小鼠尾巴, 让血液富集成一滴, 用血糖仪测定空腹血糖, 测定值认定为 0 min 的血糖值。操作尽量轻柔, 使小鼠不至于过度惊吓;
4. 让小鼠适应 30min 之后, 开始准备腹腔注射葡萄糖(IP GTT)或灌胃葡萄糖(OGTT)。
5. IP GTT: 将小鼠轻轻抓起, 按照标准的腹腔注射操作作用 1 ml 注射器给小鼠注射葡萄糖溶液。注射的体积根据小鼠的体重决定, 每 g 体重注射 0.01 ml。从注射完毕一刻起, 开始计时;
6. OGTT: 将小鼠轻轻抓起, 按照标准灌胃操作作用 1 ml 注射器连接灌胃针给于小鼠葡萄糖溶液。灌胃的体积根据小鼠的体重决定, 每 g 体重灌胃 0.01 ml。从灌胃完毕一刻起, 开始计时。



7. 一般情况下，每只小鼠的操作间隔在 1 min，这样可以准确的按照所规定时间完成对每只小鼠的血糖测定。
8. 在 15 min, 30 min, 60 min, 90 min, 120 min 按照步骤 3 的操作测定每只小鼠各个时间点的血糖值；
9. 实验完毕后，将每笼小鼠补充上饲料。用 Excel 软件分析实验结果。



2.胰岛素耐受实验(ITT)

试剂和仪器:

人胰岛素(Novolin R, 40 U/ml, Novo Nordisk), 生理盐水(0.85% NaCl), 血糖仪(GLUCOCARD II Series Test Meter, ARKRAY)和血糖试纸(GLUCOCARD Test Strip II, ARKRAY)。

注意事项:

在胰岛素耐受实验中, 胰岛素的用量要根据小鼠的年龄和性别来决定, 一般来讲理想的胰岛素用量应该使葡萄糖水平在注射 30min 后下降到注射前的 40%左右。小鼠胰岛素耐受实验的胰岛素使用量一般为 0.5 U 至 1.2 U 每公斤体重 (0.5-1.2 U/kg), 根据具体的实验要求将胰岛素稀释到合适浓度。如胰岛素使用量是 0.5 U/kg, 则用生理盐水(saline)配置 0.05 U/ml 的胰岛素溶液。

操作步骤:

1. 小鼠准备: 每组实验(如不同基因型或给药组)小鼠数量不得少于 6 只, 对照组必须是同年龄、同性别的小鼠。于上午 9 点将小鼠换入干净的笼子禁食, 禁食 4 小时, 至下午 1 点。禁食期间, 小鼠保持正常的饮水;
2. 下午 1 点, 开始胰岛素耐受实验。称取每只小鼠的体重, 并用标记笔在小鼠尾巴的根部标记序号, 以便在实验过程中能快速的辨认所测小鼠;
3. 将小鼠从笼子中取出, 轻放于铁网格之上, 用剪刀剪去小鼠尾巴末端约 1-2 mm, 轻轻挤压小鼠尾巴, 让血液富集成一滴, 用血糖仪测定血糖, 测定值认定为 0 min 的血糖值。操作尽量轻柔, 使小鼠不至于过度惊吓;
4. 让小鼠适应 30 min 之后, 开始准备腹腔注射胰岛素溶液;
5. 将小鼠轻轻抓起, 按照标准的腹腔注射操作用 1 ml 注射器给小鼠注射胰岛素溶液。注射的体积根据小鼠的体重决定, 每 g 体重注射 0.01 ml。从注射完毕一刻起, 开始计时。一般情况下, 每只小鼠的操作间隔在 1 min, 这样可以准确的按照所规定时间完成对每只小



鼠的血糖测定;

6. 在 15 min, 30 min, 45 min, 60 min 按照步骤 3 的操作测定每只小鼠各个时间点的血糖值;
7. 实验完毕后, 将每笼小鼠补充上饲料。用 Excel 软件分析实验结果。



3.丙酮酸耐受实验(Pyruvate challenge test)

试剂和仪器:

丙酮酸(Cat: PD0462, Sangon), 生理盐水(0.85% NaCl), 血糖仪(GLUCOCARD II Series Test Meter, ARKRAY)和血糖试纸(GLUCOCARD Test Strip II, ARKRAY)。

注意事项:

1. 丙酮酸是糖异生(gluconeogenesis)的底物, 本实验在腹腔注射入丙酮酸溶液后, 通过检测血糖上升的幅度, 可以用来评估小鼠糖异生的能力。在本实验中, 选用丙酮酸或丙酮酸钠盐进行实验都可以;
2. 小鼠丙酮酸耐受实验的丙酮酸使用量一般为 1.5 g 或者 2 g 每公斤体重(1.5 or 2 g/kg), 根据具体的实验要求配置合适的浓度的丙酮酸溶液。如丙酮酸使用量是 2 g/kg, 则用生理盐水(saline)配置 20%的丙酮酸溶液。

操作步骤:

1. 小鼠准备: 每组实验(如不同基因型或给药组)小鼠数量不得少于 6 只, 对照组必须是同年龄、同性别的小鼠。于实验前一天下午 5 点将小鼠换入干净的笼子禁食, 禁食 16 小时, 至次日上午 9 点。禁食期间, 小鼠保持正常的饮水;
2. 次日上午九点, 开始丙酮酸耐受实验。称取每只小鼠的体重, 并用标记笔在小鼠尾巴的根部标记序号, 以便在实验过程中能快速的辨认所测小鼠;
3. 空腹基础血糖的测定: 将小鼠从笼子中取出, 轻放于铁网格之上, 用剪刀剪去小鼠尾巴末端约 1-2 mm, 轻轻挤压小鼠尾巴, 让血液富集成一滴, 用血糖仪测定空腹血糖, 测定值认定为 0 min 的血糖值。操作尽量轻柔, 使小鼠不至于过度惊吓;
4. 让小鼠适应 30 min 之后, 开始准备腹腔注射丙酮酸钠溶液;
5. 将小鼠轻轻抓起, 按照标准的腹腔注射操作用 1 ml 注射器给小鼠注射丙酮酸溶液。注射的体积根据小鼠的体重决定, 每 g 体重注射 0.01 ml。从注射完毕一刻起, 开始计时。一般情况下, 每只小鼠的操作间隔在 1 min, 这样可以准确的按照所规定时间完成对每只小



鼠的血糖测定;

6. 在 15 min, 30 min, 60 min, 90 min, 120 min 按照步骤 3 的操作测定每只小鼠各个时间点的血糖值;
7. 实验完毕后, 将每笼小鼠补充上饲料。用 Excel 软件分析实验结果。



4.小鼠血清胰岛素的测定(ELISA)

试剂和仪器:

Rat/Mouse Insulin ELISA kit(Cat: EZRMI-13K, LINCO Research), 酶标仪 (Sunrise™, TECAN)。

注意事项:

血液里胰岛素的测定可以选用血浆或血清进行测定, 我们所采用的是用血清来作为样品, 分析其中的胰岛素水平。

操作步骤:

根据实验的具体需要(如 fast status, fed status, glucose-stimulation, etc), 采集不同处理方式小鼠的血样进行分析。

1. 小鼠血清样本的制备:

- 1) 用毛细管通过小鼠的眼眶采血约 50 ul, 将血液置于没有抗凝剂的 0.5 ml EP 管, 将血样放置于 4 °C 冰箱, 让其凝结 2-4 h;
- 2) 将凝结后的血样在 4 °C 冷冻离心机用 4000 g 的速度离心 15 min;
- 3) 将上清液(血清)转移到新的 EP 管中, 进行后续的 ELISA 实验。如需要保存, 则根据需要按合适体积分装, 保存于 -80 °C 冰箱。切忌反复冻融;

2. 血清胰岛素水平的测定(ELISA):

测定的具体的步骤根据 ELISA kit 所带的使用说明书来进行。我们所使用的 Linco 公司的 Rat/Mouse Insulin ELISA kit 的具体操作步骤如下;

- 1) 将 kit 中提供的 10×Wash buffer 用 Milli Q H₂O 稀释到 1×的工作液。如 50 ml 10×Wash buffer 加入 450 ml Milli Q H₂O;
- 2) 取出合适数量的包被有胰岛素单抗的 ELISA strips 放入板架中, 其它剩余的 ELISA strips 放入包装袋中, 封好置于 4 °C 保存。将 ELISA strips 的每个孔用 300 ul 稀释好的 wash buffer 清洗 3 遍。清洗之后, 倒掉 wash buffer, 然后在卫生纸上轻轻拍打, 以去掉孔中残



- 留的液体。但是注意在进行下一步操作之前，不要使孔完全干掉，以免影响实验结果；
- 3) 安排好空白对照，标准品，QC 以及样品的加样方式，即哪些孔加空白对照哪些孔加 QC 和标准品，哪些孔加样品。可能的话，采用复孔的加样方式；
 - 4) 在空白对照的孔中，加入 10 ul Assay Buffer 和 10 ul Matrix Solution；在标准品和 QC 的孔中加入 10 ul 不同浓度的标准品或 QC 和 10 ul Matrix Solution，标准品浓度为：10 ng/ml，5 ng/ml，2 ng/ml，1 ng/ml，0.5 ng/ml，0.2 ng/ml；在样品的孔中加入 10 ul 所需检测的血清样品和 10 ul Assay Buffer。加样的过程要尽可能的迅速，防止孔完全干掉；
 - 5) 向每个反应孔中加入 80 ul Detection Antibody。为了得到最好的实验结果，此加样步骤应该在 1 h 内完成。将加样完毕的板架上的 ELISA strips 用封口膜封好，置于脱色摇床上以合适速度轻轻振摇，于室温下孵育 2 h；
 - 6) 去掉封口膜，倒掉孔中反应的液体，在卫生纸上轻轻拍打，以去掉孔中残留的液体；
 - 7) 将每个反应孔用 300 ul 稀释好的 wash buffer 清洗 3 遍。清洗之后，倒掉 wash buffer，然后在卫生纸上轻轻拍打，以去掉孔中残留的液体；
 - 8) 向每个反应孔中加入 100 ul Enzyme Solution。然后将 ELISA strips 用封口膜封好，置于脱色摇床上以合适速度轻轻振摇，于室温下孵育 30 min；
 - 9) 去掉封口膜，倒掉孔中反应的液体，在卫生纸上轻轻拍打，以去掉孔中残留的液体；
 - 10) 将每个反应孔用 300 ul 稀释好的 wash buffer 清洗 6 遍。清洗之后，倒掉 wash buffer，然后在卫生纸上轻轻拍打，以去掉孔中残留的液体；
 - 11) 向每个反应孔中加入 100 ul Substrate Solution，然后用锡箔纸将 ELISA strips 封住，以使每个反应孔避光。置于脱色摇床上以合适速度轻轻振摇，于室温下孵育约 30 min。通过和底物的反应，反应孔中的液体会变成蓝色，蓝色的深浅程度与胰岛素的含量成正比。在此步骤中应随时注意观察颜色的变化，因为蓝色的形成速度根据室温的变化会加快或变慢。根据蓝色变化的快慢应精确控制孵育的时间，可能小于或大于 30 min。评判孵育时间的标准，是参考空白对照孔和最低浓度的标准品(0.2 ng/ml)之间的蓝色的差异，等到这两个反应孔之间的蓝色深浅出现差异的时候，即可停止孵育；



- 12) 向每个反应孔中加入 100 ul Stop Solution, 用手轻轻拍打板架使液体充分混匀, 并去除气泡。这是反应孔中的颜色会由蓝色变成黄色。然后, 在 5 min 中内, 用酶标仪读取各个孔在以 450 nm 波长下的光吸收值;
- 13) 用 Excel 软件分析实验结果, 根据标准品的浓度值和光吸收数值, 取对数值做标准曲线, 根据标准曲线换算出检测样品的浓度值。



5.小鼠机体脂肪含量分析(DEXA 检测)

试剂和仪器:

三溴乙醇(Cat: 90710, Sigma-Aldrich)麻醉剂(50×贮液, 配制方法: 将 25 g 三溴乙醇溶于 15.5 ml 叔戊醇(Cat: A-1685, Sigma-Aldrich), 37 °C水浴放置约 1 h 直至溶解完全, 期间不时摇动以促进溶解。将贮液用生理盐水稀释成 1×的工作液), PIXImus II dual energy X-ray absorptiometry (DEXA) system (Lunar, GE Medical System)。

注意事项:

1. 小鼠的麻醉要充分, 避免在扫描过程中移动;
2. 如果要通过 DEXA 进行小鼠的骨密度分析, 需要将在实验开始前将小鼠禁食 16 小时以上。

操作步骤:

1. 接通电源, 打开 PIXImusII DEXA 仪器和所连接的电脑, 双击电脑桌面上的 Lunar PIXI
2. 程序图标以打开 DEXA 程序;
3. 在 DEXA 程序主界面按 F6 键, 打开“quality control”的界面;
4. 按照提示, 将 QC phantom 置于托盘中, 确认摆放方向位置正确, 然后放至 DEXA 仪器的检测位置;
5. 确认后按 F3 键开始 QC 扫描, 扫描过程中不要点击鼠标或键盘上的任何键;
6. QC 通过之后, 按 F8 推出 QC 程序, 回到 DEXA 程序主界面。只有在 QC 通过之后, 才能进行小鼠的扫描分析。如果 QC 没有通过, 注意调整 phantom 的摆放位置, 重新开始 QC 扫描(即步骤 2-4), 直到 QC 通过为止;
7. 准备需要检测的小鼠, 称取小鼠体重, 按照体重腹腔注射相应剂量的麻醉剂(0.01 ml/g BW), 比如 20 g 体重的小鼠, 腹腔注射三溴乙醇麻醉剂(1×)0.2 ml。因为三溴乙醇的麻醉时间比较短, 所以建议麻醉一只, 扫描检测一只;
8. 在 DEXA 程序主界面按 F3 键, 打开扫描程序界面。输入需要填写的相关信息, 比如小鼠的 ID, 出生日期, 体重, 操作人姓名等等。确认后按“Enter”键完成信息输入;



9. 将麻醉好的小鼠置于托盘上，确认摆放方向位置正确，然后放至 DEXA 仪器的检测位置。
10. 确认后按 F3 键开始扫描，扫描过程中不要点击鼠标或键盘上的任何键；
11. 扫描完成后，取出小鼠，放入笼内。在完成的界面显示一个小鼠的扫描影像及其外周的绿色方框。连续按 3 下 F3 键进入分析程序界面。通过箭头键调整绿色方框的大小和位置，使其圈住小鼠的除了头部和尾巴的整个躯干部分，然后按“Enter”键确认，得到分析的结果。分析结果有绿色方框内的小鼠躯干部分的总重量，lean 的重量，脂肪的重量，以及计算得到的脂肪含量(脂肪的重量/总重量)；
12. 结果分析完毕后，连续按 2 次 F8 推出结果分析界面而回到 DEXA 程序主界面。按照步骤 7-10 进行下一只小鼠的扫描检测。



6.小鼠胰岛的分离纯化

试剂和仪器:

Collagenase Type V(Cat: C9263, Sigma-Aldrich), Histopaque 1077(Cat: 10771, Sigma-Aldrich), RPMI 1640 medium(含 11 mM D-glucose, Cat: 22400, Invitrogen Gibco), HBSS(NaCl 114 mM, KCl 4.7 mM, KH₂PO₄ 1.2 mM, MgSO₄ 1.16 mM, HEPES 20 mM, CaCl₂ 2.5 mM, NaHCO₃ 25.5 mM, adjust the pH to 7.2-7.4 by NaOH)。体视变焦显微镜(SMZ800, Nikon), 冷冻离心机(5810R, Eppendorf)。

注意事项:

1. 在分离胰腺时, 通过胆总管的灌注部分很重要, 一定要使胰腺, 尤其是胰尾部分要膨胀充分;
2. 在操作中要注意除了 RPMI 1640 medium, 所有的溶液在使用中都要提前预冷;
3. 在最后用 20 ul 移液器挑取胰岛时, 在室温进行即可, 但速度要尽可能的快;
4. 正常情况下, 每只小鼠能够抽提出大约 60-80 个左右的中等大小的胰岛, 根据不同的实验需要安排所需要抽提的小鼠数目。

操作步骤:

1. 将小鼠用引颈法处死, 快速打开腹腔, 在体式显微镜下找到胆总管, 在靠近十二指肠的部分用手术线将胆总管结扎;
2. 将肝脏上翻, 分离胆总管, 将其上附着的脂肪轻轻剥离。用显微镊夹住胆总管的上端(靠近肝脏), 然后用 4 号半的医用头皮针插入胆总管, 用 5 ml 注射器连接头皮针通过胆总管往胰腺灌注预冷的 collagenase 溶液(1 mg/ml collagenase in HBSS, ice-cold)。一般推注 2-3 ml collagenase 溶液可以使小鼠的胰腺充分膨胀;
3. 将充分膨胀的胰腺分离出来, 放入 50 ml 离心管中, 再加入 collagenase 溶液 2 ml, 置于 37 °C 水浴消化 28 min。消化期间, 轻轻摇动管子, 使消化充分。注意: 消化的时间和水浴温度都很重要, 要尽可能准确;



4. 消化结束后，把管子置于漩涡振荡器上振摇 10 s，此时胰腺已经被分解成糜状的组织，加入 15 ml 预冷的 HBSS，摇匀以终止消化；
5. 在 4 °C，用 Eppendorf 5810R 离心机以 1000 rpm 离心 30 s，倒掉上清液；
6. 将沉淀用 10 ml 预冷的 HBSS 重悬洗涤，不要用漩涡振荡器，用 1 ml 移液器轻轻将沉淀重悬。将重悬后的悬浊液移入 10 ml 离心管中。在 4 °C，用 Eppendorf 5810R 离心机以 1000 rpm 离心 30 s，倒掉上清液；
7. 将上一步所得的沉淀用 5 ml Histopaque 1077 重悬，不要用漩涡振荡器，用 1 ml 移液器轻轻将沉淀重悬。然后用 10 ml 注射器轻轻加入 5 ml 预冷的 HBSS，加入的速度要轻柔，使 HBSS 沿着管壁轻轻滑下。加完后，下面 5 ml 为 Histopaque，上面 5 ml 为 HBSS，因为两种液体密度的差异，中间能形成清晰地界面；
8. 在 4 °C，用 Eppendorf 5810R 离心机以 2200 rpm 离心 30 min。注意：在此步骤的离心中，需要将离心机的加速和减速都调整到最慢速度。且用水平转子不能用角转子；
9. 离心结束后，取出管子，可以看见在管子中央，不同的密度液体的界面处分布着一层沙状的白色小颗粒，即为初步分离纯化的胰岛。用巴氏吸管小心的吸出中间层的胰岛，用预冷的 HBSS 洗涤：将吸出的胰岛置于 5 ml 预冷的 HBSS 中，用手轻轻敲打管子，使胰岛分散均匀。然后在 4 °C，以 1000 rpm 离心 30 s，将上清弃掉。用预冷的 HBSS 按上述步骤重复洗涤一遍；
10. 将洗涤后的胰岛用含有 10%胎牛血清的 RPMI 1640 培养基重悬，然后放置于 6 cm 培养皿中。在体视显微镜下，用 20 ul 移液器挑取胰岛，对胰岛进行进一步的分选。注意：之所以要进行此步骤，是因为初步分离的胰岛中含有少量的消化下来的胰腺的外分泌细胞；
11. 将挑取出来的胰岛放入含有 10%胎牛血清的 RPMI 1640 培养基中，用 6 cm 培养皿在 95% air+5% CO₂ 的环境下 37 °C于培养箱中培养，以进行下一步的实验。



7.分离胰岛的胰岛素分泌(GSIS)

试剂和仪器:

Krebs-Ringer buffer(NaCl 115 mM, KCl 5.4 mM, CaCl₂ 2.38 mM, MgSO₄ 0.8 mM, Na₂HPO₄ 1 mM, HEPES 10 mM), BSA, fatty acid free(Cat: A8806, Sigma-Aldrich), Rat/Mouse Insulin ELISA kit Cat: EZRMI-13K, LINCO Research), 葡萄糖(glucose)贮液(1 M), 精氨酸(arginine)贮液(0.5 M), KRB buffer (Krebs-Ringer buffer+0.2% fatty acid free BSA)。

注意事项:

1. 胰岛纯化出来后, 应该在 RPMI 1640 中培养过夜, 这样可以恢复胰岛的功能。因为分离纯化不可避免会对胰岛造成一定的损伤, 原代培养过夜后, 胰岛外层受损的细胞会脱落, 胰岛表面会重新形成包膜, 轮廓变得圆润清晰。在实验开始前, 要注意观察所培养的胰岛的状态, 如果胰岛的轮廓毛糙, 证明胰岛抽提中损伤过大, 不宜用于进行分泌实验;
2. 所有的溶液都要通过高压或过滤灭菌达到无菌的细胞培养的要求;
3. 每组胰岛至少应该安排 4 个孔, 即 60 个大小均一的胰岛以上;
4. 葡萄糖或精氨酸刺激后的培养液用于胰岛素的 ELISA 检测时, 应用 KRB buffer 稀释 5-10 倍。

操作步骤:

1. 准备 12 孔板, 每个孔加入 750 ul 的 KRB buffer;
2. 在体视显微镜下, 将 CO₂ 培养箱中培养的胰岛用 20 ul 移液器挑选出来, 放入 12 孔板中, 每个孔放入 15-20 个胰岛, 尽量保证各个孔的胰岛大小, 数目一致;
3. 将 12 孔板于 37 °C CO₂ 培养箱中放置 1 h, 让胰岛适应培养液的转换(从 RPMI 1640 到 KRB buffer);
4. 将 12 孔板从培养箱中取出, 放置桌上轻轻旋转摇动, 胰岛会慢慢聚集到每个孔的中央。用 20 ul 移液器将胰岛移入到加有 KRB buffer + 2.8 mM glucose 的新的 12 孔板中, 每个孔 750 ul。然后将其置于 37 °C CO₂ 培养箱放置 1 h, 以得到胰岛的基础胰岛素分泌(basal



secretion)水平;

5. 将 12 孔板从培养箱中取出, 放置桌上轻轻旋转摇动, 胰岛会慢慢聚集到每个孔的中央。
移取 100 ul 培养液于 EP 管中, 放置于冰上保存, 用于随后的基础胰岛素分泌水平的检测;
 - 1) 葡萄糖刺激下的胰岛素分泌: 用 20 ul 移液器将胰岛移入到加有 KRB buffer + 16.7 mM glucose 的新的 12 孔板中, 每个孔 750 ul。然后将其置于 37 °C CO₂ 培养箱 1 h, 以得到胰岛在糖刺激下的胰岛素的分泌(glucose-stimulated secretion)水平。
 - 2) 精氨酸刺激下的胰岛素分泌: 用 20 ul 移液器将胰岛移入到加有 KRB buffer + 10 mM arginine 的新的 12 孔板中, 每个孔 750 ul。然后将其置于 37 °C CO₂ 培养箱 1 h, 以得到胰岛在精氨酸刺激下的胰岛素的分泌(arginine-stimulated secretion)水平。
6. 将 12 孔板从培养箱中取出, 放置桌上轻轻旋转摇动, 胰岛会慢慢聚集到每个孔的中央。
移取 100 ul 培养液于 EP 管中, 放置于冰上保存, 用于随后的葡萄糖或精氨酸刺激下胰岛素分泌水平的检测;
7. 用 20 ul 移液器将胰岛移入到 EP 管中, 加入 1 ml HBSS 或 KRB buffer, 然后以 1000 rpm 在室温离心 2 min。沉淀下来的胰岛可以保存于-80 °C冰箱, 以备用于提取蛋白或 RNA 之类的实验;
8. 将步骤 5 和步骤 6 得到的培养液于 4 °C, 5000 rpm 离心 5 min, 以去掉某些脱离的细胞碎片或杂质。上清液移入到新的 EP 管, 用于胰岛素的 ELISA 检测。也可以将上清分装保存于-80 °C备用, 但避免反复冻融。



8.小鼠的灌流

试剂和仪器:

多聚甲醛(Cat: P6148, Sigma-Aldrich), 1×PBS(NaCl 137 mM, KCl 2.7 mM, Na₂HPO₄ 10mM, KH₂PO₄ 2 mM), LEAD-1 型灌流仪(保定兰格恒流泵有限公司)

注意事项:

灌流的过程中最重要的就是保证准确地将灌流的头皮针扎入左心室。建议选择心尖稍微偏左一点的位置, 扎入的时候, 尽量让头皮针以与心脏边缘贴近的角度由上而下插入心尖部位。如果入针的角度太大, 比如说与心脏边缘垂直, 则容易扎穿左心室而使灌流从右心室进入肺循环, 此时, 可以看到小鼠的嘴部会有灌流的液体流出。

操作步骤:

1. 准备需要检测的小鼠, 称取小鼠体重, 按照体重腹腔注射相应剂量的麻醉剂(0.01 ml/g BW), 比如 20 g 体重的小鼠, 腹腔注射三溴乙醇麻醉剂(1×)0.2 ml, 等候约 1 min, 至小鼠处于完全麻醉的状态;
2. 将麻醉好的小鼠的胸腔打开, 暴露心脏。然后将灌流仪打开, 用 1×PBS 清洗灌流仪的管道, 调整灌流仪的水流速度到合适速度;
3. 用镊子轻轻夹住心脏, 用眼科剪剪掉右心耳, 这时会有大量的血液流出, 充满整个胸腔。然后迅速用灌流仪上连接的头皮针扎入左心室, 即心尖的部分, 注意扎入的深度, 不要太深, 以免穿过左心室。扎入之后, 1×PBS 会迅速使整个心脏的颜色由血红色变为泛白的浅红色;
4. 保持灌流 1×PBS 直至小鼠的肝脏由血红色变为泛白的浅红色, 然后将灌流液由 1×PBS 换成 4%多聚甲醛固定液;
5. 保持灌流 4%多聚甲醛固定液。小鼠的尾巴在 4%多聚甲醛的固定作用下, 会渐渐地翘起来, 肝脏在此刻也会逐渐变成黄色。此时, 证明灌流成功;
6. 停止灌流, 在 4%多聚甲醛的固定作用下, 可以感觉到小鼠的身体已经变硬, 证明各组织



的预固定有很好的效果。将所需要分析的组织取出，继续固定于 4%多聚甲醛中。用蒸馏水清洗灌流仪。



9.小鼠胰腺的组织学分析—石蜡包埋

试剂和仪器:

多聚甲醛(Cat: P6148, Sigma-Aldrich), 石蜡(Cat: A6330, Sigma-Aldrich), 石蜡包埋机(EG1160, Leica)。

注意事项:

1. 根据胰腺的大小来确定脱水的时间, 如果胰腺的比较小, 则脱水 15 min 即可。脱水步骤的具体时间需要一定的经验的积累;
2. 透明的时间并不固定, 一定要通过肉眼观察来确定, 胰腺变成如玛瑙般的褐黄色透明状即可;
3. 固定液的选择应该根据具体的实验要求来确定。多聚甲醛是很常用的固定液, 适合进行免疫组化, 免疫荧光等方面的实验; 如果只是进行形态的观察(HE 染色), 可以选用 Bouin's 固定液; 如果要进行电镜分析的小体积样品, 则建议采用戊二醛进行固定。

操作步骤:

1. 将小鼠按照标准操作灌流后, 分离出用 4%多聚甲醛预固定的胰腺组织, 再放入至少 20 倍胰腺体积的 4%多聚甲醛中在 4°C继续固定过夜(8-12 h)。注意: 在胰腺的分离时, 从脾脏开始, 先分离与脾脏粘连的胰尾部分, 然后再慢慢分离与胃和肠粘连的胰头部分。将胰腺完全取出后, 用镊子轻轻将胰腺捏成团状, 再放入 4%多聚甲醛中固定;
2. 将固定好的胰腺放入装有蒸馏水的 50 ml 试管中进行清洗, 清洗过程中可以将管子放于脱色摇床上, 用较低的速度轻轻摇动, 摇动速度不应过高, 否则会将固定的团状胰腺摇散。总共清洗 3-4 次, 每次 10-15 min;
3. 将清洗完毕的胰腺放入至少 20 倍胰腺体积的 50%的乙醇中, 放置于脱色摇床上, 轻轻摇动, 进行逐级脱水, 时间 20 min;
4. 进行 70%, 80%, 95%三种不同的乙醇浓度的逐级脱水。放置于脱色摇床上, 轻轻摇动, 脱水时间 20 min;



5. 将胰腺移入到 100%的无水乙醇中进行脱水处理 2 次，注意每次都要换用新的无水乙醇。
放置于脱色摇床上，轻轻摇动，每次脱水 10 min，总共 20 min；
6. 将经过脱水处理的胰腺移入到 50%二甲苯/50%无水乙醇中，然后置于脱色摇床上，轻轻摇动 15 min。这时可以看到在二甲苯的作用下，胰腺会有一定程度的透明；
7. 将胰腺移入到 100%二甲苯中，放置于脱色摇床上，轻轻摇动。在此透明的步骤中，注意随时观察，直到胰腺变为像玛瑙般黄褐色透明状，则可以停止透明步骤。时间大约为 10-20 min，以颜色观察为准；
8. 将透明好的胰腺放入 60 °C的石蜡中进行浸蜡的步骤。每隔 1 h 换一次石蜡，总共换 4 次石蜡，时间为 4 h。**注意：在浸蜡步骤中，第 3, 4 次的浸蜡一定要用新的石蜡；**
9. 将浸蜡好的胰腺置于 60 °C的石蜡进行包埋。包埋时，因为胰腺的特殊结构，要注意去除气泡。包埋好的蜡块放置于室温过夜后再开始切片。



10.小鼠胰腺的组织学分析—胰腺的连续切片

试剂和仪器:

石蜡切片机(RM2135, Leica), 展片机(HI1210, Leica)。

注意事项:

1. 在切片时, 如果出现碎片的情况, 有可能是因为刀片不太锋利引起的, 所以我们一边建议选择新的刀片; 也有可能是因为组织块过于干燥引起的, 可以在切片时用沾水的棉花轻轻擦拭切面, 会得到较好的效果;
2. 因为统计上的分析显示, 小鼠胰岛的大小一般小于 150 μm , 所以在获得胰腺的连续切片上, 一般选择前后两张切片之间相差至少 150 μm 。

操作步骤:

1. 将包埋好的胰腺的石蜡块, 用刀片修成合适的大小和形状, 放置于切片机上的相应位置, 安装上新的刀片, 根据切片的要求调整蜡块的位置;
2. 开始切片时, 用刀片对蜡块再进行精细的修整, 直到有合适大小组织的切片的出现;
3. 调整切片的厚度至你实验所需的厚度, 对于胰腺的组织学分析, 一般选用 5-6 μm 厚度的切片即可;
4. 选用 5 μm 厚度进行切片, 将 6-8 个连续的胰腺切片连成的条放置于 42 $^{\circ}\text{C}$ 水浴的展片机中进行展片。观察到切片完全展开后, 即立刻用 APES 处理的载玻片将其取出, 使切片附着在载玻片上。注意展片的时间不宜过长, 否则会使切片中的组织破裂;
5. 连续切取 30 片胰腺切片, 丢弃不要。这一步骤的目的是使前后的两张胰腺切片之间相隔至少 150 μm , 这样能在统计上确保两张胰腺切片上存在的是不同的胰岛;
6. 重复步骤 5 和 6, 直到切片中组织的大小比初始时的切片中的组织还要小的时候, 则可以停止切片。根据胰腺的大小不同, 一般来讲, 一个胰腺组织能获得 10 张左右有效的切片;
7. 将切好的胰腺的切片置于 55 $^{\circ}\text{C}$ 的烘箱中, 烘烤过夜, 使切片与玻片贴合紧密。切好的玻片可以用来进行一系列的组织学实验。





11.小鼠胰腺的组织学分析—HE 染色

试剂和仪器:

Harris 氏苏木素染液, 伊红染液, 0.25%氨水, 中性树胶(上海标本模型厂)。染液的配 制:

Harris 氏苏木素染液(苏木素 2.5g, 无水酒精 25ml, 硫酸铝钾 50g, 黄色氧化汞 1.25g, 冰醋酸 20ml, 蒸馏水 500ml), 配制时, 先将苏木素溶于酒精, 取一个 2000ml 的三角烧瓶, 倾入硫酸铝钾, 加入蒸馏水, 于电炉上加热, 熔解钾明矾, 完全熔解后, 待温度至 90°C左右时, 加入预先溶解好的酒精苏木素, 继续加热至沸腾, 延续 3-5min, 此时溶液逐渐加深, 变为紫红色, 拔离电源, 加入黄色氧化汞, 当充分氧化后, 重新插上电源继续加热 3-5min, 此时溶液变深紫色, 拔去电源, 直接将三角烧瓶插入预先准备好的冰水里, 放于暗处, 第二天 过滤后加入冰醋酸, 即可使用三个月。伊红染液(伊红 1g, 70%酒精 100ml), 先将伊红用蒸 馏水(少许)调成浆糊状, 再加入酒精, 边加边搅拌, 直到彻底溶解, 此时试剂有些混浊, 取 少许冰醋酸, 加入到试剂中去, 试剂逐渐转变为清亮, 呈鲜红色, 染色效果好。

注意事项:

1. 苏木素染色的时间一般为 3-5 min, 伊红的染色时间一般为 30 s, 但要根据染液使用的时间长久来决定, 最好的做法是先做预实验来确定具体染色的时间;
2. 所有操作在通风处中进行。

操作步骤:

1. 胰腺的石蜡切片用二甲苯脱蜡: 二甲苯(I)10min—二甲苯(II)5 min;
2. 切片通过不同浓度的各级乙醇复水, 具体操作为: 100%乙醇 1 min—95%的乙醇 1 min—85%乙醇 1 min—70%乙醇 1 min—50%乙醇 1 min—蒸馏水洗 1 min;
3. 用苏木素溶液染色 3-5min, 具体的染色时间根据预实验确定;
4. 将切片用自来水洗涤 2 次, 每次 30 s;
5. 将切片放入 0.25%的氨水中返蓝 30 s, 在碱性的条件下, 苏木素染色会变成蓝色;
6. 将切片用自来水洗涤 2 次, 每次 30 s;



7. 切片通过不同浓度的各级乙醇脱水，具体操作为：50%乙醇 1 min—75%的乙醇 1 min— 85%乙醇 1 min—95%乙醇 1 min;
8. 将切片放入伊红溶液中，染色 30 s，具体的染色时间根据预实验确定；
9. 将切片继续脱水，具体操作为：95%乙醇 1 min—100%的乙醇 1 min—100%乙醇 1 min；
10. 将切片置于二甲苯中透明：二甲苯(A)2 min—二甲苯(B)2 min；
11. 用中性树脂封片。封片时，先将盖玻片用二甲苯浸泡，然后再封片，避免气泡。



12.小鼠的日基础摄食量检测

试剂和仪器:

葡萄糖(Cat: G6125, Sigma-Aldrich), 生理盐水(0.85% NaCl), 分析天平。

注意事项:

1. 在摄食检测的实验中, 天平的精确度为 0.1g;
2. 在检测小鼠禁食后的摄食量和禁食后葡萄糖刺激下的摄食量时, 因为不像日基础摄食量那样对于每只小鼠连续检测 7 天后取平均值, 所以需要增加被检测小鼠的数量, 以获得较为准确的结果。

操作步骤:

1. 小鼠准备: 每组实验(如不同基因型或给药组)小鼠数量不得少于 6 只, 对照组必须是同年龄、同性别的小鼠。每个鼠笼放入一只小鼠, 正常给予饲料和水, 让小鼠适应 3 天;
2. 上午九点, 将小鼠换入新的鼠笼, 加入一定量的饲料, 记录饲料的初始重量为 W_0 。小鼠每天吃掉的常规饲料的量约为 3-4 g, 所以, 饲料加入的量在 10 g 左右即可;
3. 次日上午九点, 收集剩余的饲料及笼内被小鼠咬碎的零散饲料, 加在一起称重, 重量记录为 W_1 。小鼠当天的基础摄食量为 $W_1 - W_0$;
4. 将小鼠再换入新的鼠笼, 重复步骤 3 和 4。连续检测 7 天;
5. 将每天的基础摄食量的数据相加, 除以检测的天数, 得到的平均值, 即为小鼠的日基础摄食量。

(一) 检测小鼠的禁食后摄食量

1. 小鼠准备: 每组实验(如不同基因型或给药组)小鼠数量不得少于 10 只, 对照组必须是同年龄、同性别的小鼠。每个鼠笼放入一只小鼠, 正常给予饲料和水, 让小鼠适应 3 天。
2. 下午 5 点, 将小鼠换入干净的笼子禁食, 禁食 16 小时, 至次日上午 9 点。禁食期间, 小鼠保持正常的饮水。
3. 次日上午九点, 加入一定量的饲料(约 10 g), 记录饲料的初始重量, 记为 W_0 。



4. 1 小时后，收集剩余的饲料及笼内被小鼠咬碎的零散饲料，加在一起称重，重量记录为 W_1 。
5. 计算 $W_1 - W_0$ 的值，即为小鼠禁食后的摄食量。

(二) 检测小鼠的禁食后葡萄糖刺激下的摄食量

1. 小鼠准备：每组实验(如不同基因型或给药组)小鼠数量不得少于 10 只，对照组必须是同年龄、同性别的小鼠。每个鼠笼放入一只小鼠，正常给予饲料和水，让小鼠适应 3 天。
2. 下午 5 点，将小鼠换入干净的笼子禁食，禁食 16 小时，至次日上午 9 点。禁食期间，小鼠保持正常的饮水。
3. 次日上午九点，按照标准的腹腔注射操作用 1 ml 注射器给小鼠注射葡萄糖溶液。葡萄糖溶液的浓度根据葡萄糖的使用量来决定，如果葡萄糖的使用量是 2 g/kg 体重，则配置 20% 的葡萄糖。注射的体积根据小鼠的体重来决定，每 g 体重注射 0.01 ml。
4. 注射后将小鼠放回鼠笼，立即加入一定量的饲料(约 10 g)，记录饲料的初始重量，记为 W_0 。
5. 1 小时后，收集剩余的饲料及笼内被小鼠咬碎的零散饲料，加在一起称重，重量记录为 W_1 。
6. 计算 $W_1 - W_0$ 的值，即为小鼠禁食后葡萄糖刺激下的摄食量。



13.小鼠的体温的检测

试剂和仪器:

JM624U 便携式数字温度计(天津今明仪器有限公司)。

注意事项:

1. 在本实验中,我们以检查小鼠直肠的温度来反映小鼠的体温。
2. 根据实验需要,选择不同时间对小鼠的体温进行检查。如果需要检测夜间小鼠的体温,建议使用暗室红灯照明。(3)因为小鼠体温的变化较大,建议小鼠数量在每组 10 只以上。

操作步骤:

1. 小鼠准备: 每组实验(如不同基因型或给药组)小鼠数量不得少于 10 只,对照组必须是同年龄、同性别的小鼠。
2. 将小鼠从笼子中取出,轻放于铁网格之上。将小鼠的尾巴向上提起,露出肛门,将温度计的传感器轻轻插入肛门,插入深度约 1 cm。
3. 让传感器在小鼠体内保持约 30 s,直到温度计上显示的温度稳定下来,此时温度便记为小鼠的直肠温度或体温。
4. 将小鼠放回笼内,记录体温,用 Excel 软件分析实验结果。



14.小鼠血浆活性胰高血糖素样肽 1(GLP-1)的测定(ELISA)

试剂和仪器:

Glucagon-like peptide-1 (active) ELISA kit(Cat: EGLP-35K, LINCO Research), 荧光酶标仪 (FL×800 TBEP, Bio-Tek), DPP-IV inhibitor (Cat: DPP4, Millipore)。

注意事项:

GLP-1 是由小肠 L 细胞分泌的一种多肽, 其活性形式是 GLP-1 (7-36) amide 和 GLP-1 (7-37)。然而在体内, GLP-1 的活性形式很容易被 DPP-IV 降解成 GLP-1 (9-36) amide 和 GLP-1 (9-37)等非活性形式。本试剂盒是检测活性形式的 GLP-1, 包括 GLP-1 (7-36) amide 和 GLP-1 (7-37), 而不能检测到其被 DPP-IV 降解后的非活性形式。所以, 在血液样品的制备时, 要采用 DPP-IV 的抑制剂来防止血液中活性形式的 GLP-1 的降解。

操作步骤:

1. 准备 EDTA 抗凝管: 配置 15 g/L 的 EDTA-3K 溶液(1.5 g EDTA-3K 溶于 100 ml MilliQ 水); 向 0.5 ml EP 管中加入 30 ul EDTA 溶液, 然后将其置于 55 °C烘箱中, 水分蒸发完毕后即制成 EDTA 抗凝管。
2. 根据实验的具体需要(如 fast status, fed status, glucose-stimulation, etc), 采集不同处理方式的小鼠的血样进行分析。用毛细管通过小鼠的眼眶采血约 300 ul, 将血液置于 EDTA 抗凝管中, 立即(在 30 秒之内)向血液中加入 3 ul 的 DPP-IV 抑制剂, 然后迅速上下颠倒试管, 使血液与 EDTA, DPP-IV 抑制剂混合均匀。之后立刻将血样放置于冰上。
3. 在 1 小时内, 将血样在 4 °C冷冻离心机用 1000 g 的速度离心 10 min。注意: 必须在血样采集后 1 小时内分离血浆, 否则会影响检测结果。
4. 将上清液(血浆)转移到新的 EP 管中, 进行后续的 ELISA 实验。如需要保存, 则根据需要将血浆按合适体积分装, 保存于-80 °C冰箱。切忌反复冻融。
5. 血浆活性 GLP-1 水平的测定(ELISA): 测定的具体的步骤根据 ELISA kit 所带的使用说明书来进行。我们所使用的 Linco 公司的 Glucagon-like peptide-1 (active) ELISA kit 的具体操



做步骤如下:

- 1) 试剂准备: A.将 kit 中提供的 10×Wash buffer 用 MilliQ H₂O 稀释到 1×的工作液。如 50 ml 10× Wash buffer 加入 450 ml MilliQ H₂O。稀释好的 wash buffer 可以在室温保存。B.将 kit 中提供的 10 mg Substrate 粉末用 1 ml MilliQ H₂O 溶解, 配置成 Substrate 贮液, 贮液分装保存在-80 °C。临用时, 取出合适用量的贮液, 用 kit 中提供的 Substrate Diluent 按 1:200 的比例稀释成 Substrate 工作液。比如, 向 20 ml Substrate Diluent 中加入 100 ul Substrate 贮液。Substrate 贮液和 Substrate 工作液都要避光保存。
- 2) 向包被有 GLP-1 单抗的 ELISA 板的每个反应孔加入 300 ul 稀释好的 wash buffer, 室温放置 5 min。倒掉 wash buffer, 然后在卫生纸上轻轻拍打, 以去掉孔中残留的液体。但是注意在进行下一步操作之前, 不要使孔完全干掉, 以免影响实验结果。
- 3) 安排好空白对照, 标准品, QC 以及样品的加样方式, 即哪些孔加空白对照哪些孔加 QC 和标准品, 哪些孔加样品。可能的话, 采用复孔的加样方式。
- 4) 在空白对照的孔中, 加入 200 ul Assay Buffer; 在标准品和 QC 的孔中加入 100 ul 不同浓度的标准品或 QC 和 100 ul Assay Buffer, 标准品浓度为: 100 pM, 50 pM, 20 pM, 10 pM, 5 pM, 2 pM; 在样品的孔中加入 100 ul 所需检测的血浆样品和 100 ul Assay Buffer。加样完毕后, 用手轻轻敲打 ELISA 板, 是各个反应孔的液体充分混匀。
- 5) 将加样完毕的 ELISA 板用封口膜封好, 放置于 4 °C 冰箱, 孵育 20-24 h。
- 6) 去掉封口膜, 倒掉孔中反应的液体, 在卫生纸上轻轻拍打, 以去掉孔中残留的液体。
- 7) 将每个反应孔用 300 ul 稀释好的 wash buffer 清洗 5 遍, 每次清洗时, 需要在加入 wash buffer 后于室温静止 5 min。清洗之后, 倒掉 wash buffer, 然后在卫生纸上轻轻拍打, 以去掉孔中残留的液体。
- 8) 立即向每个反应孔中加入 200 ul Detection Conjugate。然后将 ELISA strips 用封口膜封好, 置于脱色摇床上以合适速度轻轻振摇, 于室温下孵育 2 h。
- 9) 去掉封口膜, 倒掉孔中反应的液体, 在卫生纸上轻轻拍打, 以去掉孔中残留的液体。
- 10) 将每个反应孔用 300 ul 稀释好的 wash buffer 清洗 3 遍。清洗之后, 倒掉 wash buffer, 然



后在卫生纸上轻轻拍打，以去掉孔中残留的液体。

- 11) 向每个反应孔中加入 200 ul Substrate 工作液，然后用锡箔纸将 ELISA 板封住，以使每个反应孔避光。置于脱色摇床上以合适速度轻轻振摇，于室温下孵育 30 min。
- 12) 向每个反应孔中加入 50 ul Stop Solution，用手轻轻拍打板架使液体充分混匀，并去除气泡。用锡箔纸包裹 ELISA 板，在室温避光放置 5 min。
- 13) 用荧光酶标仪读取各个孔的荧光数值。激发光波长：355 nm；发射光波长：460 nm。

用 Excel 软件分析实验结果，根据标准品的浓度值和光吸收数值，取对数值做标准曲线，根据标准曲线换算出检测样品的浓度值。



15.小鼠血清胃抑制性多肽(GIP)的测定(ELISA)

试剂和仪器:

Rat/Mouse GIP (total) ELISA kit(Cat: EZRMGIP-55K, LINCO Research), 酶标仪 (Sunrise™, TECAN)。

注意事项:

血液里 GIP 的测定可以选用血浆或血清进行测定, 我们所采用的是用血清来作为样品, 分析其中的 GIP 水平。

操作步骤:

1. 根据实验的具体需要(如 fast status, fed status, glucose-stimulation, etc), 采集不同处理方式的小鼠的血样进行分析。小鼠血清样本的制备;
2. 用毛细管通过小鼠的眼眶采血约 50 μ l, 将血液置于没有抗凝剂的 0.5 ml EP 管, 将血样放置于 4 °C 冰箱, 让其凝结 2-4 h;
3. 将凝结后的血样在 4 °C 冷冻离心机用 4000 g 的速度离心 15 min;
4. 将上清液(血清)转移到新的 EP 管中, 进行后续的 ELISA 实验。如需要保存, 则根据需要按合适体积分装, 保存于 -80 °C 冰箱。切忌反复冻融;
5. 血清 GIP 水平的测定(ELISA): 测定的具体的步骤根据 ELISA kit 所带的使用说明书来进行。我们所使用的 Linco 公司的 Rat/Mouse GIP (total) ELISA kit 的具体操作步骤如下:
 - 1) 试剂准备: A.将 kit 中提供的 10 \times Wash buffer 用 Milli Q H₂O 稀释到 1 \times 的工作液。如 50 ml 10 \times Wash buffer 加入 450 ml MilliQ H₂O。稀释好的 wash buffer 可以在室温保存。B.向 kit 中的装有标准蛋白的冻干粉(1 ng)的玻璃瓶中加入 0.5 ml MilliQ H₂O。上下颠倒玻璃瓶数次, 之后静置 5 min 使其溶解完全, 得到的标准品的浓度为 2000 pg/ml。将此标准品按 1:3 的比例, 用 Assay Buffer 稀释, 配置成一系列不同浓度的标准品, 浓度分别为 666.6 pg/ml, 222.2 g/ml, 74.1 pg/ml, 24.7 pg/ml, 8.2 pg/ml。稀释好的标准品放置于 -80 °C 保存。



- 2) 取出合适数量的包被有 GIP 单抗的 ELISA strips 放入板架中，其它剩余的 ELISA strips 放入包装袋中，封好置于 4 °C 保存。将 ELISA strips 的每个孔加入 300 ul 稀释好的 wash buffer，室温放置 5 min。倒掉 wash buffer，然后在卫生纸上轻轻拍打，以去掉孔中残留的液体。但是注意在进行下一步操作之前，不要使孔完全干掉，以免影响实验结果。
- 3) 安排好空白对照，标准品，QC 以及样品的加样方式，即哪些孔加空白对照哪些孔加 QC 和标准品，哪些孔加样品。可能的话，采用复孔的加样方式。
- 4) 在空白对照的孔中，加入 90 ul Assay Buffer 和 10 ul Matrix Solution；在标准品和 QC 的孔中加入 10 ul 不同浓度的标准品或 QC，10 ul Matrix Solution 和 80 ul Assay Buffer，标准品浓度为：2000 pg/ml，666.6 pg/ml，222.2 g/ml，74.1 pg/ml，24.7 pg/ml，8.2 pg/ml；在样品的孔中加入 10 ul 所需检测的血清样品和 90 ul Assay Buffer。为了得到最好的实验结果，此加样步骤应该在 30 min 内完成。
- 5) 将加样完毕的板架上的 ELISA strips 用封口膜封好，置于脱色摇床上以合适速度轻轻振摇，于室温下孵育 1.5 h。
- 6) 去掉封口膜，倒掉孔中反应的液体，在卫生纸上轻轻拍打，以去掉孔中残留的液体。
- 7) 将每个反应孔用 300 ul 稀释好的 wash buffer 清洗 3 遍。清洗之后，倒掉 wash buffer，然后在卫生纸上轻轻拍打，以去掉孔中残留的液体。
- 8) 向每个反应孔中加入 100 ul Detection Antibody。然后将 ELISA strips 用封口膜封好，置于脱色摇床上以合适速度轻轻振摇，于室温下孵育 1 h。
- 9) 去掉封口膜，倒掉孔中反应的液体，在卫生纸上轻轻拍打，以去掉孔中残留的液体。
- 10) 将每个反应孔用 300 ul 稀释好的 wash buffer 清洗 3 遍。清洗之后，倒掉 wash buffer，然后在卫生纸上轻轻拍打，以去掉孔中残留的液体。
- 11) 向每个反应孔中加入 100 ul Enzyme Solution。然后将 ELISA strips 用封口膜封好，置于脱色摇床上以合适速度轻轻振摇，于室温下孵育 30 min。
- 12) 将每个反应孔用 300 ul 稀释好的 wash buffer 清洗 3 遍。清洗之后，倒掉 wash buffer，然后在卫生纸上轻轻拍打，以去掉孔中残留的液体。



- 13) 向每个反应孔中加入 100 ul Substrate Solution, 然后用锡箔纸将 ELISA strips 封住, 以使每个反应孔避光。置于脱色摇床上以合适速度轻轻振摇, 于室温下孵育约 30 min。通过和底物的反应, 反应孔中的液体会变成蓝色, 蓝色的深浅程度与胰岛素的含量成正比。在此步骤中应随时注意观察颜色的变化, 因为蓝色的形成速度根据室温的变化会加快或变慢。根据蓝色变化的快慢应精确控制孵育的时间, 可能小于或大于 30 min。评判孵育时间的标准, 是参考空白对照孔和最低浓度的标准品(0.2 ng/ml)之间的蓝色的差异, 等到这两个反应孔之间的蓝色深浅出现差异的时候, 即可停止孵育。
- 14) 向每个反应孔中加入 100 ul Stop Solution, 用手轻轻拍打板架使液体充分混匀, 并去除气泡。这是反应孔中的颜色会由蓝色变成黄色。然后, 在 5 min 中内, 用酶标仪读取各个孔在以 450 nm 波长下的光吸收值。
- 15) 用 Excel 软件分析实验结果, 根据标准品的浓度值和光吸收数值, 取对数值做标准曲线, 根据标准曲线换算出检测样品的浓度值。



16.小鼠血清胰高血糖素(Glucagon)的检测(ELISA)

试剂和仪器:

Glucagon (Human, Mouse, Rat) ELISA kit(Cat: 48-GLUHU-E01, ALPCO Diagnostics), 酶标仪 (Sunrise™, TECAN)。

注意事项:

血液里胰高血糖素的测定可以选用血浆或血清进行测定, 我们所采用的是用血清来作为样品, 分析其中的胰高血糖素水平。

操作步骤:

1. 根据实验的具体需要(如 fast status, fed status, glucose-stimulation, etc), 采集不同处理方式的小鼠的血样进行分析。小鼠血清样本的制备;
2. 用毛细管通过小鼠的眼眶采血约 200 ul, 将血液置于没有抗凝剂的 0.5 ml EP 管, 将血样放置于 4 °C 冰箱, 让其凝结 2-4 h;
3. 将凝结后的血样在 4 °C 冷冻离心机用 4000 g 的速度离心 15 min;
4. 将上清液(血清)转移到新的 EP 管中, 进行后续的 ELISA 实验。如需要保存, 则根据需要 将血清按合适体积分装, 保存于-80 °C 冰箱。切忌反复冻融;
5. 血清胰高血糖素水平的测定(ELISA): 测定的具体的步骤根据 ELISA kit 所带的使用说明书 来进行。我们所使用的 ALPCO 公司的 Glucagon ELISA kit 的具体操作步骤如下:
 - 1) 试剂准备: A.将 kit 中提供的 20×wash solution 用 MilliQ H₂O 稀释到 1×的工作液。如 50 ml 20×wash buffer 加入 950 ml MilliQ H₂O。稀释好的 wash solution 可以在室温保存。B.向 kit 中的装有标准蛋白的冻干粉(10 ng)的玻璃瓶中加入 1 ml buffer solution A, 上下颠倒玻璃瓶数次, 之后静置 5min 使其溶解完全, 得到的标准品的浓度为 10000pg/ml。将此标准品按 1:3 的比例, 用 buffer solution A 稀释, 配置成一系列不同浓度的标准品, 浓度分别为 3333 pg/ml, 1111 g/ml, 370 pg/ml, 123 pg/ml, 41 pg/ml。稀释好的标准品放置于-80 °C 保存。C.向 kit 中的 装有 labeled antigen 冻干粉的玻璃瓶中加入 6 ml buffer solution B, 上



下颠倒 玻璃瓶数次，之后静置 5 min 使其溶解完全，得到 labeled antigen solution 置于-80 °C 保存。

- 2) 取出合适数量的包被有 Glucagon 抗体的 ELISA strips 放入板架中，其它剩余的 ELISA strips 放入包装袋中，封好置于 4 °C 保存。安排好空白对照，标准品以及样品的加样方式，即哪些孔加空白对照哪些孔加 QC 和标准品，哪些孔加样品。可能的话，采用复孔的加样方式。
- 3) 在空白对照的孔中，加入 50 ul buffer solution A 和 50 ul labeled antigen solution；在标准品的孔中加入 50 ul 不同浓度的标准品和 50 ul labeled antigen solution，标准品浓度为：10000 pg/ml, 3333 pg/ml, 1111 pg/ml, 370 pg/ml, 123 pg/ml, 41 pg/ml；在样品的孔中加入 50 ul 所需检测的血清样品和 50 ul labeled antigen solution。
- 4) 将加样完毕的板架上的 ELISA strips 用封口膜封好，置于 4 °C 冰箱，孵育 44-48 h。
- 5) 孵育完毕后，去掉封口膜，倒掉孔中反应的液体，在卫生纸上轻轻拍打，以去掉孔中残留的液体。
- 6) 将每个反应孔用 350 ul 稀释好的 wash solution 清洗 3 遍。清洗之后，倒掉 wash solution，然后在卫生纸上轻轻拍打，以去掉孔中残留的液体。
- 7) 向每个反应孔中加入 100 ul SA-HRP solution。然后将 ELISA strips 用封口膜封好，置于脱色摇床上以合适速度轻轻振摇，于室温下孵育 1h。
- 8) 将 kit 中的 OPD tablet 溶解于 12 ml substrate buffer 中，得到 substrate solution。注意：substrate solution 要在临用前配置。
- 9) 去掉封口膜，倒掉孔中反应的液体，在卫生纸上轻轻拍打，以去掉孔中残留的液体。
- 10) 将每个反应孔用 350 ul 稀释好的 wash solution 清洗 3 遍。清洗之后，倒掉 wash solution，然后在卫生纸上轻轻拍打，以去掉孔中残留的液体。
- 11) 向每个反应孔中加入 100 ul substrate solution，然后用锡箔纸将 ELISA strips 封住，以使每个反应孔避光。置于脱色摇床上以合适速度轻轻振摇，于室温下孵育 约 20 min。通过和底物的反应，反应孔中的液体会颜色形成。



- 12) 向每个反应孔中加入 100 ul stop solution, 用手轻轻拍打板架使液体充分混匀, 并去除气泡。
在 5 min 中内, 用酶标仪读取各个孔在以 490 nm 波长下的光吸收值。
- 13) 用 Excel 软件分析实验结果, 根据标准品的浓度值和光吸收数值, 取对数值做标准曲线, 根据标准曲线换算出检测样品的浓度值。