



# 小鼠代谢相关检测技术手册

广州奥科生物医学科技有限公司

[www.aokemedical.com](http://www.aokemedical.com)

## 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 H<sub>2</sub>O 稀释到 1×的工作液。如 50 ml 10×Wash buffer 加入 450 ml Milli Q H<sub>2</sub>O;
- 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, KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub> 1.2 mM, MgSO<sub>4</sub> 1.16 mM, HEPES 20 mM, CaCl<sub>2</sub> 2.5 mM, NaHCO<sub>3</sub> 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% CO<sub>2</sub> 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, CaCl<sub>2</sub> 2.38 mM, MgSO<sub>4</sub> 0.8 mM, Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub> 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 CO<sub>2</sub> 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 CO<sub>2</sub> 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 CO<sub>2</sub> 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 CO<sub>2</sub> 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 CO<sub>2</sub> 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, Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub> 10mM, KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub> 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  $\mu\text{m}$ , 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  $\mu\text{m}$ 。

### 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  $\mu\text{m}$  厚度的切片即可;
4. 选用 5  $\mu\text{m}$  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  $\mu\text{m}$ , 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. 用中性树脂胶封片。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 W1。
5. 计算  $W1 - W0$  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 W0。
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 W1。
6. 计算  $W1 - W0$  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 H<sub>2</sub>O 稀释到 1×的工作液。如 50 ml 10× Wash buffer 加入 450 ml MilliQ H<sub>2</sub>O。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 H<sub>2</sub>O 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  $\mu$ 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 H<sub>2</sub>O 稀释到 1 $\times$ 的工作液。如 50 ml 10 $\times$ Wash buffer 加入 450 ml MilliQ H<sub>2</sub>O。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 H<sub>2</sub>O。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 H<sub>2</sub>O 稀释到 1×的工作液。如 50 ml 20×wash buffer 加入 950 ml MilliQ H<sub>2</sub>O。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。