

کیت سنجش انسولین به روش الایزا

حیطه کاربرد: کیت الایزای انسولین پیش‌تاز طب، برای سنجش کمی انسولین در سرم انسان طراحی شده است. این کیت تنها برای تشخیص آزمایشگاهی می‌باشد.

مقدمه:

انسولین یک هورمون پلی پپتیدی است که متابولیسم کربوهیدرات را تنظیم می‌کند. انسولین عامل اصلی در هموستاز کربوهیدرات است و تأثیراتی بر متابولیسم چربی دارد که می‌تواند توانایی کبد در آزادسازی ذخایر چربی را تغییر دهد. سلول‌های بتا پانکراس، انسولین را به روشی وابسته به گلوکز آزاد می‌کنند. انسولین در موارد زیر نیز نقش دارد: کنترل دریافت سلولی گلوکز در بافت عضلانی و چربی، افزایش تکثیر DNA و سنتز پروتئین، اصلاح فعالیت آنزیم‌های متعدد (اثر آلوستریک)، افزایش گلیکوژن، سنتز اسیدهای چرب، جذب اسیدهای آمینه، کاهش پروتئولیز، لیپولیز و گلوکونئوزن.

شرایط مختلفی وجود دارد که در آن‌ها اختلال انسولین پاتولوژیک است: تومور پانکراس، سندرم متابولیک، سندرم کوشینگ، آکرومگالی، سندرم تخمدان پلی کیستیک و مهم‌ترین آن‌ها یعنی دیابت. دو نوع دیابت وجود دارد: نوع ۱ (تخریب سلول‌های بتای تولید کننده انسولین در پانکراس با واسطه خودایمنی که منجر به کمبود مطلق انسولین می‌شود) و نوع ۲ (سندرم چند عاملی با تأثیر ترکیبی ژنتیکی و عوامل محیطی که شناخته شده‌ترین آن‌ها چاقی، سن و کم تحرکی بدن است و منجر به مقاومت به انسولین در سلول‌هایی می‌شود که برای جذب گلوکز به انسولین نیاز دارند). در هر دو نوع این بیماری، تولید انسولین باید با دارو یا تزریق انسولین افزایش یابد. تعیین میزان کمی انسولین می‌تواند به تعیین دوز کمک کند. از طرفی کیت سنجش انسولین به شناسایی مقاومت به انسولین در بیماران دیابتی نوع ۲ نیز کمک می‌کند و می‌تواند نشان دهد که چه زمانی ممکن است تزریق انسولین علاوه بر داروهای خوراکی ضروری باشد. سنجش انسولین همچنین به تشخیص تومور در سلول‌های جزایر پانکراس (انسولینوم) کمک می‌کند و در تعیین علت پایین بودن گلوکز خون (هیپوگلیسمی) موثر است.

اساس آزمایش:

اساس کیت کمی سنجش انسولین به روش الایزای ساندویچ و با استفاده از آنتی‌بادی‌های مونوکلونال می‌باشد. در این روش چاهک‌ها توسط آنتی‌بادی مونوکلونال علیه یکی از شاخص‌های آنتی‌ژنیک انسولین پوشش داده می‌شوند (Coating). نمونه بیماران با آنتی‌بادی پوشش داده شده در ته چاهک و آنتی‌بادی ثانویه ضد انسولین متصل به آنزیم HRP انکوبه می‌گردد. مقدار کمپلکس ایمنی تشکیل شده در چاهک‌ها با غلظت انسولین در نمونه‌ها متناسب است. پس از شستشو، محلول رنگزا که محتوی هیدروژن پراکسید (H_2O_2) و کروموزن است داخل چاهک‌ها ریخته می‌شود که رنگ آبی پدید آمده متناسب با کمپلکس ایمنی تشکیل شده در چاهک‌ها است. با افزودن محلول متوقف کننده رنگ آبی به زرد تبدیل می‌شود که بهترین جذب نوری را در طول موج ۴۵۰ نانومتر دارد.

محتویات کیت:

- ۱) پلیت دارای چاهکهای پوشش داده شده با آنتی‌بادی مونوکلونال ضد انسولین.
- ۲) محلول آنزیم کونژوگه غلیظ (Enzyme Conjugate): ویال حاوی محلول غلیظ (۱۰X) آنتی‌بادی ضد انسولین متصل شده به آنزیم پراکسیداز (جهت تهیه کونژوگه آماده مصرف، مقدار مورد نیاز را با رقیق کننده کونژوگه به نسبت ۱/۱۰ رقیق نمایید).
- ۳) سری استانداردها (Standards Set): شامل ۶ ویال از استاندارد با غلظت‌های ۰، ۱۰، ۲۵، ۵۰، ۷۵ و ۱۰۰ $\mu IU/mL$ از انسولین. (استانداردسازی شده با ماده‌ی مرجع بین‌المللی 2^{nd} WHO IS 11/212) (آماده برای مصرف).
- ۴) سرم کنترل پایین (Low Control Serum): یک ویال حاوی مقدار مشخص انسولین رقیق شده در محلول بافری دارای پروتئین به عنوان پایدار کننده و ۰/۰۵٪ کاتن به عنوان ماده محافظ (آماده برای مصرف). غلظت دقیق کنترل روی ویال ذکر شده است.



- (۵) سرم کنترل بالا (High Control Serum): یک ویال حاوی مقدار مشخص انسولین رقیق شده در محلول بافری دارای پروتئین به عنوان پایدار کننده و ۰/۰۵٪ کاتن به عنوان ماده محافظ (آماده برای مصرف). غلظت دقیق کنترل روی ویال ذکر شده است.
- (۶) محلول رقیق کنندهی کونژوگه (Conjugate Diluent): ویال حاوی محلول بافری دارای پروتئین به عنوان پایدار کننده (آماده برای مصرف).
- (۷) محلول رنگزای یک مرحله‌ای (Chromogen-Substrate): ویال حاوی تترامتیل بنزیدین و آب اکسیژنه (آماده برای مصرف).
- (۸) محلول شستشو (Wash Buffer): ویال حاوی محلول شستشوی غلیظ (۲۰x) دارای محلول بافر فسفات و ۰/۰۵٪ تونین؛ جهت تهیه محلول شستشوی آماده مصرف، مقدار مورد نیاز را با آب مقطر به نسبت ۱/۲۰ رقیق نمایید.
- (۹) محلول متوقف کننده (Stop Solution): ویال حاوی اسید کلریدریک ۱ نرمال.
- (۱۰) برچسب مخصوص پلیت.
- (۱۱) دستورالعمل مصرف.

مواد و وسایل مورد نیاز که در کیت موجود نمی‌باشند:

- (۱) دستگاه الایزا ریدر دارای فیلتر ۴۵۰ نانومتر (در صورت امکان ۶۳۰ نانومتر به عنوان فیلتر رفرانس)
- (۲) سمپلهای دقیق و کالیبره ۵۰ و ۱۰۰ میکرولیتری و سر سمپلهای مخصوص یک بار مصرف
- (۳) کاغذ نمگیر
- (۴) آب مقطر

نکات قابل ذکر برای مصرف کنندگان:

- (۱) محتویات این کیت تنها برای مصرف در همین کیت قابل استفاده هستند.
- (۲) تمامی محتویات کیت تنها برای استفاده تشخیصی در آزمایشگاه می‌باشند.
- (۳) تنها پرسنل آموزش دیده بایستی از این تست استفاده نمایند.
- (۴) این کیت صرفاً جهت اندازه‌گیری انسولین در سرم انسانی طراحی و ساخته شده است.
- (۵) از مخلوط کردن محتویات کیت‌ها با شماره ساخت‌های مختلف جداً خودداری نمایید.
- (۶) کلیه مواد موجود در کیت که منشاء سرمی دارند از نظر وجود HBSAG و آنتی‌بادی‌های HCV و HIV کنترل گردیده‌اند و فاقد این عوامل می‌باشند. جهت احتیاط بهتر است کاربرانی که با کیت کار می‌کنند از تماس مستقیم با مواد بپرهیزند و از وسایل ایمنی لازم در آزمایشگاه استفاده نمایند.
- (۷) نمونه بیماران، استانداردها، کنترل‌ها و چاهک‌های استفاده شده، باید به عنوان پسماندهای عفونی در نظر گرفته شوند. تمام محلول‌های واکنش‌گر و معرف‌ها باید مطابق با مقررات ملی دفع پسماندهای عفونی امحاء شوند.

شرایط نگهداری:

- (۱) کیت را در یخچال بین دمای ۲ تا ۸ درجه سانتی‌گراد نگهداری نمایید.
- (۲) چاهک‌ها را در کیسه مخصوص پلیت همراه با نمگیر نگهداری نمایید.
- (۳) پایداری محتویات کیت تا پایان مدت انقضای نوشته شده بر روی هر یک از آن‌ها می‌باشد.

۴) ممکن است در محلول شستشوی غلیظ کریستال تشکیل شود که این امر مشکلی را ایجاد نمی‌نماید. قبل از تهیه محلول شستشوی کار، برای حل شدن کریستال‌ها، ویال را در ۳۷ درجه سانتی‌گراد قرار دهید. محلول شستشو را به نسبت ۱/۲۰ به میزان مورد نیاز با آب مقطر رقیق نمایید؛ این محلول (آماده مصرف) به مدت یک هفته در شرایط ۲-۸ درجه سانتی‌گراد قابل نگهداری و مصرف می‌باشد.

جمع آوری و آماده سازی نمونه:

سرم را می‌توان پس از جدا نمودن از لخته خون استفاده نمود. نمونه‌ی سرم می‌تواند برای مدت حدود ۳ روز در دمای اتاق و یک هفته در دمای ۵ درجه‌ی سانتی‌گراد نگهداری شود. همچنین در دمای ۲۰- درجه‌ی سانتی‌گراد تا ۱ ماه پایدار است. (در ضمن باید از Freeze - thaw نمودن نمونه پرهیز شود) از نمونه‌های مشکوک به آلودگی میکروبی جهت انجام آزمایش استفاده نشود.

توضیحات عمومی:

- ۱) قبل از شروع مراحل آزمایش تمام مواد و نمونه‌ها باید به درجه حرارت اتاق برسند. پلیت را بعد از رسیدن به دمای محیط از کیسه مخصوص آن خارج کرده و چاهک‌های مورد نیاز را بردارید.
- ۲) به محض شروع آزمایش کلیه مراحل باید بدون توقف انجام پذیرند. از خشک شدن چاهک‌ها در بین مراحل انکوباسیون پرهیز شود.
- ۳) حتماً از نوک سمپلر یک بار مصرف برای هر نمونه استفاده شود.
- ۴) برای کسب نتایج مطلوب باید شستشوی چاهک‌ها به صورت کامل صورت گرفته و آخرین قطرات پس از شستشو از چاهک‌ها تخلیه شوند.
- ۵) از مهم‌ترین فاکتورها در حصول نتیجه مطلوب، زمان انکوباسیون مناسب می‌باشد. بنابراین پیشنهاد می‌گردد قبل از شروع آزمایش تمام مواد و محلول‌های مورد نیاز را آماده نموده و درب آن‌ها را باز کنید، این عمل با کاهش فاصله زمانی بین مراحل سمپلینگ باعث نتایج دقیق‌تر می‌شود.

مراحل انجام آزمایش:

- ۱) تعداد چاهک‌های مورد نظر را انتخاب کرده و سایر چاهک‌ها را به همراه نمگیر درون کیسه مخصوص نگهداری پلیت قرار داده و درب آن را ببندید.
- ۲) ابتدا مقدار ۵۰ میکرولیتر از هر استاندارد، کنترل و نمونه را به داخل هر چاهک بریزید. (پیشنهاد می‌گردد که از استانداردها و نمونه‌ها به صورت دابل‌یکیت استفاده شود بدین معنی که هر استاندارد و کنترل را در دو چاهک بریزید و در انتها از میانگین جذب نوری آن‌ها برای محاسبه نتایج استفاده کنید.)
- ۳) مقدار مورد نیاز از محلول کوئوگه غلیظ را با رقیق کننده‌ی کوئوگه به نسبت ۱/۱۰ رقیق نمایید. ۱۰۰ میکرولیتر از کوئوگه‌ی آماده مصرف را به هر چاهک اضافه نموده و پلیت را به آرامی به مدت ۱۵ ثانیه تکان دهید تا محتویات آن به خوبی مخلوط شوند درب چاهک‌ها را با برچسب مخصوص پلیت پوشانده و چاهک‌ها را به مدت ۶۰ دقیقه در درجه حرارت اتاق (۲۸ - ۲۲ درجه سانتی‌گراد) انکوبه نمایید.
- ۴) محتویات چاهک‌ها را خالی کرده و چاهک‌ها را ۵ بار با محلول شستشوی آماده مصرف بشویید. برای شستشو چنان‌چه دستگاه واکش اتوماتیک در دسترس نباشد می‌توان از سمپلر ۸ کاناله استفاده نمود ولی باید مواظب بود که محلول شستشو از یک چاهک به چاهک دیگر وارد نشود زیرا می‌تواند موجب ایجاد خطا در نتیجه آزمایش گردد. در هر دفعه شستشو حدود ۳۰۰ میکرولیتر محلول شستشو در هر چاهک ریخته و سپس چاهک‌ها را با وارونه کردن و تکاندن خالی نمایید و در انتهای عملیات شستشو، چاهک‌ها را در حالت وارونه و با ضربات ملایم بر روی یک پارچه یا کاغذ نمگیر بکوبید تا قطرات اضافی خارج شوند.
- ۵) ۱۰۰ میکرولیتر محلول رنگزا (Chromogen-Substrate) به هر چاهک اضافه نمایید؛ چاهک‌ها را به مدت ۱۵ دقیقه در درجه حرارت اتاق و در تاریکی قرار دهید.
- ۶) با اضافه کردن ۱۰۰ میکرولیتر محلول متوقف کننده (Stop Solution) به هر چاهک، واکنش‌های آنزیمی را متوقف نمایید. برای سنجش جذب نوری هر چاهک از دستگاه الایزا ریدر با فیلتر ۴۵۰ nm استفاده نموده و جذب نوری چاهک‌ها را قرائت نمایید. توصیه می‌شود از فیلتر ۶۳۰ nm به عنوان فیلتر رفرانس استفاده گردد.

محاسبه نتایج:

از هر دستگاه الایزا ریدر با قابلیت سنجش جذب نوری در طول موج ۴۵۰ nm می‌توان استفاده نمود.

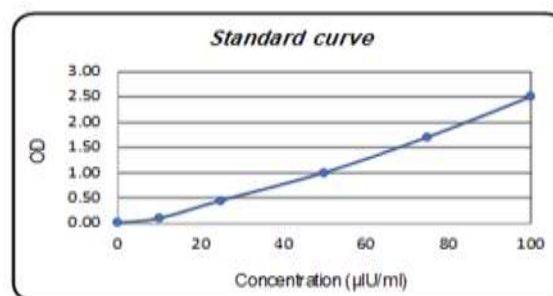
(۱) جذب نوری استانداردها، کنترل‌ها و نمونه‌ها را به کمک دستگاه الایزا ریدر در طول موج ۴۵۰ nm و در صورت امکان در مقابل فیلتر رفرانس ۶۳۰ nm بخوانید.
(۲) با استفاده از میانگین جذب نوری استانداردها و غلظت معلوم آن‌ها نموداری (Point to point) رسم کنید به این صورت که جذب نوری استانداردها را روی محور عمودی (Y) و غلظت آن‌ها را روی محور افقی (X) برده و نقطه تلاقی غلظت و جذب نوری را برای هر استاندارد بدست آورید، سپس نقاط بدست آمده را به یکدیگر وصل نمایید تا منحنی بدست آید.

(۳) میانگین جذب نوری برای هر نمونه را بدست آورده و روی محور عمودی جای آن را پیدا کنید، سپس نقطه مذکور را توسط خطی به منحنی وصل نمایید به طوری که این خط بر محور عمودی کاملاً عمود باشد و بعد از محل تلاقی خط و منحنی، خطی عمود بر محور افقی وارد کنید، نقطه تلاقی این خط با محور افقی مقدار غلظت را نشان خواهد داد.

$$1 \mu\text{IU/mL} = 1 \text{ mIU/L} = 6 \text{ pmol/L}$$

استانداردها ($\mu\text{IU/mL}$)	جذب نوری
۰	۰/۰۱
۱۰	۰/۱۰
۲۵	۰/۴۵
۵۰	۱/۰۰
۷۵	۱/۷۰
۱۰۰	۲/۵۰

Insulin Standard curve



توجه: جذب‌های نوری و منحنی مربوطه فقط به عنوان نمونه می‌باشد و هر آزمایشگاه در هر دفعه انجام آزمایش باید منحنی جدیدی رسم نماید.

ارزشیابی آزمایش:

این آزمایش با داشتن شرایط زیر ارزشمند و قابل گزارش تلقی می‌گردد:
- جذب نوری استاندارد صفر و $100 \mu\text{IU/mL}$ به ترتیب کمتر از $0/1$ و بیشتر از $1/6$ قابل قبول است.

مقادیر مورد انتظار:

غلظت انسولین در سرم خون در حالت ناشتا $25 \mu\text{IU/mL}$ — $2/6$ می‌باشد اما هر آزمایشگاه بایستی دامنه استاندارد خود را تعیین کند.

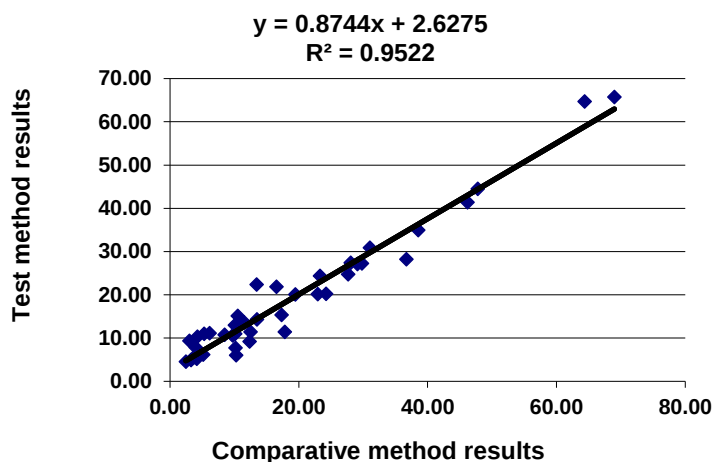
محدودیت‌های روش اندازه‌گیری:

به ندرت امکان دارد بعضی عوامل موجود در نمونه سرم، از جمله آنتی‌بادی‌های هتروفیلک، برخی داروها، اتوانتی‌بادی‌ها و نظایر این‌ها بر نتیجه آزمایش اثر بگذارند. بنابراین بهتر است تفسیر نتیجه آزمایش با در نظر گرفتن نتایج معاینات بالینی، یافته‌های تشخیصی دیگر و شرح حال بیمار انجام گیرد.

شاخص‌های اجرایی:

(۱) مطالعه مقایسه‌ای:

کیت سنجش انسولین شرکت پیش‌تاز طب با کیت تجاری مربوطه مقایسه شد. تعداد ۴۱ نمونه سرم برای تست‌های مقایسه‌ای استفاده شدند. نتایج تست‌های مقایسه‌ای بر روی نمونه‌های ذکر شده بیانگر همبستگی ۹۸٪ بین کیت پیش‌تاز طب و کیت تجاری معتبر بود.



(۲) حداقل مقدار قابل اندازه‌گیری:

جذب نوری استاندارد صفر و سه برابر انحراف معیار (SD) مبنای مرز شاهد (LoB) در این کیت می‌باشد. بر اساس جذب نوری نمونه با غلظت پایین آنالیت و سه برابر انحراف معیار (SD) حداقل غلظت قابل تشخیص انسولین در این کیت (۰/۵۷ $\mu\text{IU/ml}$) می‌باشد.

(۳) دقت آزمایش:

جهت بررسی تکرار پذیری کیت، آزمون‌های دقت درون سنجی (در یک کیت) و میان سنجی (بین چند کیت از یک سری ساخت) به وسیله سه نمونه سرمی با غلظت‌های متفاوت انسولین انجام شد که نتایج آن در جداول ذیل آمده است.

– آزمون دقت درون سنجی (Intra- assay):

CV (%)	SD (μ IU/mL)	میانگین (μ IU/mL)	تعداد دفعات تکرار تست	
۹/۱۲	۰/۷۰	۷/۶۷	۲۰	نمونه ۱
۵/۸۰	۱/۹۷	۳۳/۹۵	۲۰	نمونه ۲
۵/۸۷	۴/۹۷	۸۴/۶۳	۲۰	نمونه ۳

– آزمون دقت میان سنجی (Inter- assay):

CV (%)	SD (μ IU/mL)	میانگین (μ IU/mL)	تعداد دفعات تکرار تست	
۹/۱۹	۰/۸۹	۹/۶۸	۲۰	نمونه ۱
۸/۰۳	۲/۷۶	۳۴/۳۸	۲۰	نمونه ۲
۸/۲۰	۷/۲۵	۸۸/۴۱	۲۰	نمونه ۳

۴) ریکاوری آزمایش:

مقادیر مشخصی از انسولین به سه نمونه سرم با مقادیر معلومی از انسولین افزوده شد و ریکاوری آن‌ها محاسبه گردید که نتایج آن در جدول زیر آمده است:

* جهت تست ریکاوری از استانداردهای کیت استفاده نشود.

جدول ریکاوری:

نمونه	مقدار انسولین موجود در سرم (μ IU/mL)	مقدار انسولین افزوده شده (μ IU/mL)	مقدار مورد انتظار	مقدار بدست آمده	ریکاوری (%)
۱	۶/۹۵	۲۰/۱۹	۱۳/۵۷	۱۲/۷۲	۹۴
۱	۶/۹۵	۴۱/۷۲	۲۴/۳۴	۲۲/۶۰	۹۳
۱	۶/۹۵	۷۶/۸۳	۴۱/۸۹	۳۹/۰۴	۹۳
۲	۲۸/۳۶	۲۰/۱۹	۲۴/۲۷	۲۵/۴۰	۱۰۵
۲	۲۸/۳۶	۴۱/۷۲	۳۵/۰۴	۳۲/۴۶	۹۳
۲	۲۸/۳۶	۷۶/۸۳	۵۲/۵۹	۵۵/۹۹	۱۰۶
۳	۷۵/۱۸	۲۰/۱۹	۴۷/۶۹	۵۰/۷۸	۱۰۶
۳	۷۵/۱۸	۴۱/۷۲	۵۸/۴۵	۵۸/۵۷	۱۰۰
۳	۷۵/۱۸	۷۶/۸۳	۷۶/۰۰	۷۶/۴۵	۱۰۱

۵) خطی بودن آزمایش:

برای تایید خطی بودن تست، رقت‌های سریالی از ۳ نمونه سرم با غلظت مشخص از انسولین تهیه گردید و نتایج بر اساس ضریب رقت و درصد ریکواری محاسبه شد که در جدول زیر نتایج آن آورده شده است.

نمونه	مقدار انسولین موجود در سرم رقیق نشده ($\mu\text{IU/mL}$)	ریکواری (%)		
		رقت ۱/۲	رقت ۱/۴	رقت ۱/۸
۱	۹۶/۱۳	۹۲	۹۰	۹۲
۲	۹۹/۷۴	۹۶	۹۲	۹۱
۳	۸۰/۷۵	۹۵	۹۷	۹۸

۶) تست تداخل:

جهت بررسی تداخل کیت به سه نمونه سرم مقادیر زیر از عوامل مداخله‌گر اضافه و میزان ارزش نمونه در قبل و بعد از افزودن عوامل مداخله‌گر محاسبه شد و نتایج جدول زیر بدست آمد.

آنالیت مداخله‌گر	غلظت آنالیت مداخله‌گر	ارزش نمونه قبل از افزودن آنالیت مداخله‌گر ($\mu\text{IU/mL}$)	ارزش نمونه پس از افزودن آنالیت مداخله‌گر ($\mu\text{IU/mL}$)	ارزش مورد انتظار ($\mu\text{IU/mL}$)	ریکواری (%)
هموگلوبین	۱ mg/dl	۷/۰۸	۳/۴۱	۳/۵۴	۹۶
		۳۰/۵۲	۱۴/۵۴	۱۵/۲۶	۹۵
		۶۸/۶۳	۳۲/۹۲	۳۴/۳۲	۹۶
تری گلیسرید	۱۰۰۰ mg/dl	۷/۰۸	۳/۸۱	۳/۵۴	۱۱۰
		۳۰/۵۲	۱۴/۴۲	۱۵/۲۶	۹۴
		۶۸/۶۳	۳۵/۱۳	۳۴/۳۲	۱۰۳
بیلی روبین	۳۰ mg/dl	۷/۰۸	۳/۴۹	۳/۵۴	۹۹
		۳۰/۵۲	۱۴/۲۶	۱۵/۲۶	۹۳
		۶۸/۶۳	۳۳/۶۲	۳۴/۳۲	۹۸

۷) اختصاصیت آزمایش:

جهت بررسی اختصاصیت اثر تداخلی آنالیت‌های زیر بررسی گردید، نتایج در جدول ذیل آمده است:

اختصاصیت	آنالیت
%۱۰۰	انسولین انسانی
%۹۵	انسولین گلولایزین
%۱۰۰	انسولین گلارژین
%۰	C-peptide
%۱۰۰	لانسولین R
%۱۰۱	لانسولین B
%۹۱	لانسولین N

۸) اثر هوک (Hook Effect):

آزمایش انسولین جهت سرم‌های با غلظت بسیار بالا از این آنالیت (تا $1000 \mu\text{IU/mL}$) صورت گرفت که پدیده هوک مشاهده نشد.

References:

1. Miller, W. G. *et al.* Toward standardization of insulin immunoassays. *Clin. Chem.* 55, 1011–1018 (2009).
2. Bleich, H. L., Boro, E. S., Flier, J. S., Kahn, C. R. & Roth, J. Receptors, antireceptor antibodies and mechanisms of insulin resistance. *N. Engl. J. Med.* 300, 413–419 (1979).
3. Hiroyoshi, M. *et al.* Elevated plasma levels of glucagon-like peptide-1 after oral glucose ingestion in patients with pancreatic diabetes. *Am. J. Gastroenterol.* 94, 976–981 (1999).
4. Judzewitsch, R. G. *et al.* Chronic chlorpropamide therapy of noninsulin-dependent diabetes augments basal and stimulated insulin secretion by increasing islet sensitivity to glucose. *J. Clin. Endocrinol. Metab.* 55, 321–328 (1982).
5. Kosaka, K., Hagura, R. & Kuzuya, T. Insulin responses in equivocal and definite diabetes, with special reference to subjects who had mild glucose intolerance but later developed definite diabetes. *Diabetes* 26, 944–952 (1977).

روش انجام آزمایش انسولین به صورت شماتیک			
چاهک‌های کوت شده با آنتی‌بادی ضد انسولین			
محلول‌ها	استانداردها	سرم کنترل‌ها	نمونه
استانداردها	۵۰ میکرولیتر	-	-
سرم کنترل‌ها	-	۵۰ میکرولیتر	-
نمونه	-	-	۵۰ میکرولیتر
محلول کونژوگه رقیق شده	۱۰۰ میکرولیتر	۱۰۰ میکرولیتر	۱۰۰ میکرولیتر
پلیت را به ملایمت برای مدت ۱۵ ثانیه تکان دهید تا محتویات چاهک‌ها به خوبی مخلوط شوند و سپس دهانه چاهک‌ها را با برچسب مخصوص پلیت بپوشانید. ۶۰ دقیقه در دمای اتاق انکوبه کنید. برچسب پلیت را برداشته و محتویات چاهک‌ها را خالی کنید. طبق دستور شستشو ۵ بار چاهک‌ها را بشویید.			
محلول رنگزا	۱۰۰ میکرولیتر	۱۰۰ میکرولیتر	۱۰۰ میکرولیتر
پلیت را به مدت ۱۵ دقیقه در دمای اتاق و در تاریکی انکوبه کنید.			
محلول متوقف کننده	۱۰۰ میکرولیتر	۱۰۰ میکرولیتر	۱۰۰ میکرولیتر
جذب نوری چاهک‌ها را در طول موج ۴۵۰ نانومتر (و در صورت امکان ۶۳۰ نانومتر به عنوان فیلتر رفرانس) قرائت کنید.			