

艾狄斯™大/小鼠 型胶原 C 端肽 (CTX-) 检测试剂盒 (酶联免疫法)

使用说明书 (货号: AC-06F1)

【产品名称】

通用名称: 艾狄斯™大/小鼠 型胶原 C 端肽 (CTX-) 检测试剂盒 (酶联免疫法)

英文名称: RatLaps™ EIA kit

【包装规格】

96 人份/盒

【预期用途】

本试剂盒应用酶联免疫分析方法, 用于大/小鼠血清、尿样或体外骨吸收细胞培养上清液中 I 型胶原片段 (CTX-) 的定量测定。

仅用于科研, 不用于医学诊断。

【概要说明】

I 型胶原占骨有机基质 90% 以上, 主要在骨中合成 (1)。骨骼更新时, I 型胶原被降解, 短肽片段进入血液。可以通过在骨切片或牙质片层上培养骨细胞的方式对骨重吸收过程进行体外研究。在破骨细胞进行骨重吸收过程中, 型胶原 C 端肽会降解成片段而被释放。正是基于上述观察, RatLaps™ EIA 能够测定大小鼠血清、尿和骨细胞培养上清液中的 CTX- (2-8)。

【检验原理】

艾狄斯™大/小鼠 CTX- 检测试剂盒采用竞争性酶联免疫方法, 即多克隆抗体与可溶解的 RatLaps 的抗原 EKSQDGGR 或固相上的 RatLaps 抗原竞争性结合。简言之, 多克隆抗体用以与具有特异序列 EKSQDGGR 的多肽特异性结合, 该序列为大鼠 型胶原 C 端 α 1 链所特有。为了使 RatLaps™ EIA 标准化, 使用合成多肽 (EKSQDGGR)。

在预孵育步骤中, 生物素标记的 EKSQDGGR 结合到包被微孔的链霉亲和素。洗涤后, 标准品、质控品和待测样品 (培养上清液或大/小鼠血清或尿) 加入到相应微孔内, 再加入第一抗体 (兔多克隆系) 溶液。一级孵育后洗涤。然后加入过氧化物酶标记的山羊抗兔抗体 (第二抗体) 进行二级孵育, 第二抗体与第一抗体结合。第三次洗涤后, 加入显色底物 (TMB) 显色并用硫酸终止反应。最后于 450nm (参考 650nm) 处测量吸光度值。吸光度值与样本中待测抗原浓度成反比。

【主要组成成分】

1. 链霉抗生物素蛋白包被的微孔板 **MICROPLAT**

链霉抗生物素蛋白预包被的条形微孔板 (12×8 孔), 置于一塑料框架中。

2. RatLaps 标准品 **CAL 0**

可直接使用的含有蛋白质稳定剂和防腐剂的 TRIS 缓冲液。1 瓶 (至少 5.0 mL/瓶)。

3. RatLaps 标准品 **CAL 1-5**

可直接使用的含有合成多肽 (EKSQDGGR) 的 RatLaps 标准品 (溶于含有蛋白质稳定剂和防腐剂的 TRIS 缓冲液)。准确浓度标在各瓶上。5 瓶 (至少 0.4mL/瓶)。

4. 质控品 **CTRL**

可直接使用, 含有合成多肽 (EKSQDGGR), 溶于含有蛋白质稳定剂和防腐剂的 TRIS 缓冲液。请参考所附数据表中质控的浓度范围。1 瓶 (至少 0.4mL)。

5. 生物素标记 RatLaps 抗原 **Ag BIOTIN**

可直接使用的含有生物素标记多肽 EKSQDGGR 的溶液 (溶于含蛋白质稳定剂和防腐剂的 PBS 缓冲液)。1 瓶 (至少 12.0mL)。

6. 第一抗体 **Ab**

可直接使用的含有 型胶原 C 端 α 1 链特异多克隆抗体的溶液 (溶于含蛋白质稳定剂和防腐剂的缓冲液)。1 瓶 (至少 12.0mL)。

7. 过氧化物酶偶联的山羊抗兔 IgG **ENZYMCONJ**

可直接使用的含辣根过氧化物酶偶联的山羊抗兔 IgG 的溶液 (溶于含有蛋白质稳定剂和防腐剂的缓冲液)。1 瓶 (至少 12.0ml)。

8. 底物溶液 **SUBS TMB**

可直接使用的四甲基联苯胺 (TMB) 底物 (溶于酸性缓冲液中)。1 瓶 (至少 12.0 mL)。

9. 终止液 **H2SO4**

可直接使用的 0.18 mol/L 硫酸溶液。1 瓶 (至少 12.0 mL)。

10. 冲洗液 **WASHBUF 50x**

含有去污剂和防腐剂的浓缩清洗缓冲液。1 瓶 (至少 20.0mL)。

11. 封口膜

孵育时密封微孔板的粘性薄膜。

【储存条件及有效期】

试剂在 2-8 °C 下保存可稳定至试剂盒上所标的有效期。

未使用完的包被抗体的微孔板条应放回有干燥剂的箔袋中, 将箔袋折好并密封于塑料封口袋中。

【适用仪器】

适用于具有 450nm、650nm 波长的所有全自动、半自动酶标仪。

【样本要求】

研究体内骨疾病模型时, 强烈建议使用血清样本, 因为其波动性较小, 易获得最佳结果。也可以使用尿液样本进行检测。

重要注意事项: 样本采集时须抽取空腹血。

大/小鼠建议抽取空腹血 (禁食至少 6 小时), 如下午抽血。

血清: 大/小鼠采集空腹血。血清样本储存于 -20 °C 或以下, -20 °C 下可保存 18 个月。

尿: 采集局部尿样或者利用代谢笼等类似设备采集任何时段的尿样。保存大鼠尿样于 2-8 °C 下应不超过一周, -20 °C 或以下可长期保存。评估结果前用肌氨酸酐进行校正。

培养液: 收集骨片或牙质片层上培养的大/小鼠骨髓

胞上清液。当天收集当天检测，-20℃以下长期保存。

【检验方法】

1. 自备材料：

- 1) 制备冲洗液的容器。
- 2) 可移取20μL的高精度移液器。
- 3) 蒸馏水或去离子水。
- 4) 移取100μL的8通道或12通道高精度移液器。
- 5) 带有450nm、650nm波长的酶标仪。
- 6) 2-8℃孵育箱

2. 操作步骤：

操作前将所有溶液平衡至室温（18-22℃），混合所有试剂和待测样本（避免出现泡沫）。

根据实验所需取用合适数目的微孔条，建议所有样本进行双孔测试，每轮实验预留14个孔用于标准品和质控品。

将合适数目的微孔板条放在塑料框中，未用完的微孔板条装回含有干燥剂的箔袋中密封好。

1) 预孵育

每孔内加入100μl生物素标记的RatLaps抗原[Ag BIOTIN]，用封口膜密封微孔板，室温下（18-22℃）孵育30±5分钟。

2) 洗板

手工洗板：5次，每次每孔分配300μl洗液（1份WASHBUF 50x加入到50份蒸馏水或去离子水）；

自动洗板：参照使用说明书或实验室规则进行操作。通常洗板5次已经足够。

确保每次洗板后孔内无液体残留。

3) 一级孵育

在相应孔中分别加入20μL标准品[**CAL 0-5**]，质控品[**CTRL**]和待测样本，再于每孔内加入100μL第一抗体溶液[**Ab**]，用封口膜密封微孔板，2-8℃下孵育过夜（18±3小时）。

4) 洗板

见步骤2）。

5) 二级孵育

所有微孔内加入100μl的酶结合物[**ENZYMCONJ**]用封口膜密封微孔板，室温下（18-22℃）孵育60±5分钟。

6) 洗板

见步骤2）。

7) 加入显色底物孵育

每孔内加入100μl TMB底物溶液[**SUBS TMB**]。用封口膜密封微孔板，室温下避光孵育15±2分钟。

8) 终止显色反应

每孔内加入100μl终止液[**H₂SO₄**]。

9) 测量吸光度

加入终止液后的2小时内于450nm波长处读取吸光度。建议以650nm为参考波长。

【参考值（参考范围）】

由于年龄影响骨转换活性，因此选择合适年龄的动物应用于实验显得非常重要。小鼠（C57bl/6J种）尿RatLaps浓度平均值从110ng/mL（4周）降至18 ng/mL（10周）。10周以上年龄的RatLaps浓度值比较稳定。Lewis大鼠的RatLaps水平则从5 ng/mL（13周）减少为2 ng/mL（17周）。

【检验结果的解释】

1. 结果计算

计算每个标准品、质控品和待测样品的平均吸光率。以标准品0-5的吸光率为纵坐标，其相对应的RatLaps浓度为横坐标，利用4参数曲线拟合出一条标准曲线。依此用内插法确定质控品和待测样本中RatLaps的浓度。

2. 结果举例

项目	RatLaps 浓度 (ng/ml)	A ₄₅₀₋₆₅₀ (nm)	A ₄₅₀₋₆₅₀ (nm) 平均值	内推 RatLaps 浓度 (ng/ml)
标准0	0	2.144/2.100	2.122	
标准1	7.7	1.566/1.622	1.594	
标准2	16.0	1.346/1.351	1.349	
标准3	44.3	0.914/0.922	0.918	
标准4	86.9	0.631/0.575	0.603	
标准5	188.1	0.361/0.355	0.358	
质控		0.748/0.703	0.726	67.4
样本1		1.641/1.606	1.624	10.2
样本2		0.845/0.962	0.904	55.2
样本3		0.545/0.535	0.504	134.5

注意：以上数据仅为举例，不可用于计算任何实验的结果。

【检验方法的局限性】

如果待测样本的吸光度值低于标准品5，建议用标准品0按1:1稀释该样本，但稀释比例不超过1:3。

【产品性能指标】

1. 检测极限：2.0ng/mL

此值为低于21个空白（RatLaps标准0）平均值两个标准偏差所对应的浓度。

2. 精确度

RatLaps™ EIA的精确度用三个样本（低，中，高）进行评估。

批内差

每个样本进行21次检测。

样本	平均值 (ng/mL)	SD(ng/mL)	CV(%)
低	13.0	1.2	9.2
中	49.8	2.8	5.6
高	143.0	8.3	5.8

批间差

按照NCCLS EP5-A方案进行连续10轮检验（2）。

样本	平均值 (ng/mL)	SD(ng/mL)	CV(%)
低	13.5	2.0	14.8
中	65.0	6.8	10.5
高	140.1	15.0	10.7

3. 线性

用RatLaps™ EIA试剂盒检测标准品0稀释的大鼠血清样本，结果如下表所示：

稀释流程		期望值	观察值	回收率
血清	标准品	ng/mL	ng/mL	(%)
60.7ng/mL	0 ng/mL			
1	1	30.4	34.8	114.5
1	3	15.2	17.5	115.1
1	7	7.6	8.7	114.5
血清	标准品			
49.6ng/mL	0 ng/m			
1	1	24.8	20.1	81.0
1	3	12.4	12.8	103.2
1	7	6.2	51	82.3

【实验举例】

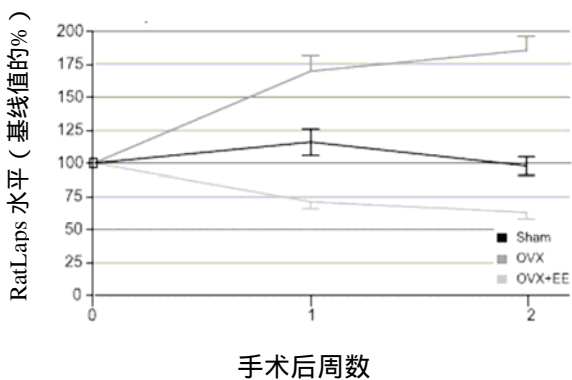
3月龄雌性大鼠 (Sprague-Dawley) 随机分成三组：(1) 假手术组 (n=10), (2) 卵巢切除术组 (OVX) (n=10), (3) 卵巢切除后皮下植 17 β -雌二醇小球组 (0.5mg, 相当于 8mg/天) (OVX+EE) (n=10)。

所有血清样本在禁食 (不提供任何食物和水) 6 小时后采集。早晨 7:00 开始禁食, 下午 13.00 收集样本。实验前的第 0 天第一次抽取血样, 采用 RatLaps™ 酶免试剂盒检测 I 型胶原片段 (CTX), Rat-MID™ 中段骨钙素酶免试剂盒检测中段骨钙素 (21-29)。所有检测结果用基线测定值的百分数 (%) 表示。图上的误差条为 SEM。

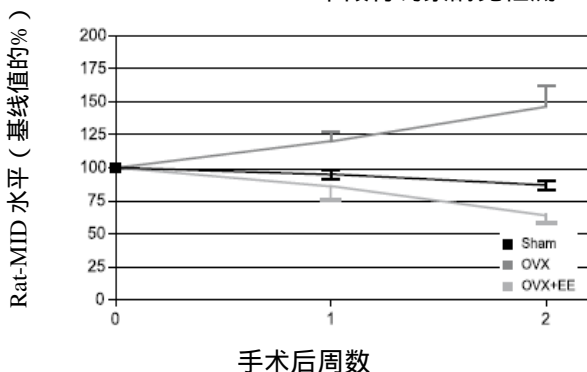
RatLaps™ 酶免试剂盒可快速检测到卵巢切除术后骨吸收增加。手术后两周内, RatLaps 水平升高至手术前的 186%。而骨吸收的增加可通过使用雌二醇抑制。同样, Rat-MID™ 中段骨钙素酶免试剂盒可检测到卵巢切除术引起的骨形成增加。手术后两周内, Rat-MID 水平升高至手术前的 146%。而骨形成的增加亦可以通过使用雌二醇抑制。

结论: 血清 RatLaps™ 和 Rat-MID™ 测定可用于检测大鼠卵巢切除术诱发的骨吸收和骨形成方面的变化。

RatLaps™ 酶免检测



Rat-MID™ 中段骨钙素酶免检测



【注意事项】

1. 本试剂盒仅用于科研, 不能在人或动物体内使用。必须严格按照包装盒里的产品说明书进行操作。对于任何不按照说明书操作而造成的损失和伤害 (当地法规规定的除外), IDS 公司概不负责。
2. 本试剂盒含有动物源材料, 须按有潜在传染能力的材料进行处理。适当的防范措施和良好的实验室习惯应该贯穿于整个储存、操作和试剂处理过程。试剂的处理应符合当地法规要求。不要使用已经过期的试剂, 不同批号的试剂不能混用。
3. 四甲基联苯胺
TMB 底物包含 3,3',5,5'-四甲基联苯胺。
R21/22 接触皮肤和吞食均有害。
S36/37 穿戴合适的衣服和手套。

【参考文献】

1. Burgeson RE. New collagens, new concepts. *Annu Rev Cell Biol* (1988)4:552-77.
2. Evaluation of Precision Performance of Clinical Chemistry Devices; Approved Guideline. *NCCLS EP5-A Vol.19, No.2, February 1999*
3. Garnero P. et al., The type I collagen fragments ICTP and CTX reveal distinct enzymatic pathways of bone collagen degradation. *J Bone Miner Res* (2003)18:859-867.
4. Grey A. et al., A role for interleukin-6 in parathyroid hormone-induced bone resorption *in vivo*. *Endocrinology* (1999)140:4683-4690.
5. Mayer J. et al., Comparison of biochemical markers of bone turnover in the ovariectomized Sprague-Dawley rat. Submitted (2002)
6. Qvist P. et al., Detection of collagen fragments generated by osteoclastic bone resorption in cultures of foetal mouse tibia; comparison to ⁴⁵Ca detection. *J Bone Miner Res* (2000)15:S465
7. Seidlova-Wuttke D. et al., Pharmacology of Cimicifuga racemosa extract BNO 1055 in rats: bone, fat and uterus. *Maturitas* (2003)44:Suppl1:S39-S50.
8. Windahl SH. et al., Female estrogen receptor beta-/- mice are partially protected against age-related trabecular bone loss. *J Bone Miner Res* (2001)16:1388-1398.

【生产企业与售后服务机构】

生产者名称: 英国 Immunodiagnostic Systems Limited (IDS Ltd)
生产者/生产场所地址: 10 Didcot Way, Boldon Business Park, Boldon, Tyne & Wear, NE35 9PD, UK

电话: +44 (0) 191 519 0660

传真: +44 (0) 191 519 0760

网址: www.idsltd.com

售后服务机构: 北京荣志海达生物科技有限公司

地址: 北京市海淀区永定路 88 号长银大厦 12 层 B12 室

电话: 010-58895646 020-32293178

传真: 010-58895611 020-32293177

电子邮箱: info@rz-biotech.com

网址: www.rz-biotech.com

【医疗器械注册证书编号】

【产品标准编号】

【说明书批准及修改日期】2008 年 11 月 21 日

仅供参考, 请以原版英文说明书为准!