

大鼠中段骨钙素检测试剂盒（酶联免疫法）

使用说明书(货号：AC-12F1)

【产品名称】

通用名称：大鼠中段骨钙素检测试剂盒（酶联免疫法）

英文名称：Rat-MID™ Osteocalcin EIA kit

【包装规格】

96 人份/盒

【预期用途】

本试剂盒采用酶联免疫分析方法用于大鼠血清和血浆中骨钙素的定量检测。仅适用于科研。

【概要说明】

骨钙素，或骨 γ -羧基谷氨酸蛋白（BGP），是骨基质中主要的非胶原蛋白。其分子量大约6000道尔顿，大多数含有49个氨基酸，包括三个 γ -羧基谷氨酸残基。而大鼠骨钙素由50个氨基酸组成（1-4）。骨钙素通过其17，21和24位上的2,3- γ -羧基谷氨酸残基与钙元素特异性结合（5）。骨钙素中段特别是20-30位的氨基酸序列，表现出很高的种内保守性（4）。

骨钙素由成骨细胞在骨中合成。合成后部分进入骨基质中，部分流入循环系统。骨钙素的明确生理作用仍不清楚。大量研究显示，骨钙素在循环系统中的水平可反映骨形成速率（4）。

作为骨转换标志物，大鼠骨钙素已应用于临床前研究中。据报道，血清水平在卵巢切除后上升。可以通过雌激素、选择性雌激素受体调节（SERMs）或双膦酸盐处理来预防雌激素缺乏性症状（6-10）。

【检验原理】

大鼠中段骨钙素检测试剂盒采用竞争性酶联免疫方法，即多克隆抗体与溶液中的骨钙素或固相上的骨钙素竞争性结合。简言之，人骨钙素多克隆抗体用以识别并结合骨钙素分子的中段部分（21-29 位氨基酸）（11）。为了使 Rat-MID™ Osteocalcin EIA 标准化，使用合成人类骨钙素。用纯化的大鼠骨钙素和大鼠血清进行平行观察。

在预孵育步骤中，生物素标记的骨钙素与包被于微孔内表面的链霉亲和素结合而被固定。洗涤后，标准品，质控品和待测样本加入到相应微孔内，再加入多克隆抗体溶液。一级孵育后洗涤。然后加入过氧化物酶标记的抗鼠免疫球蛋白进行二级孵育，其与多克隆抗体结合。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处测量吸光度。吸光度值与样本中待测骨钙素浓度成反比。

【主要组成成份】

1. 链霉亲和素包被的微孔板[MICROPLAT]

链霉亲和素蛋白预包被的条形微孔板（12条×8孔），置于一塑料框架中。

2. 骨钙素标准品[**CAL 0**]

含有蛋白质稳定剂和防腐剂的PBS缓冲的冷冻干

燥品。将标准品溶于5.0mL蒸馏水中。复溶后的标准品必须存放于-18℃以下。1瓶。

3. 骨钙素标准品1-5[**CAL 1-5**]

含有合成人骨钙素、蛋白质稳定剂和防腐剂的PBS缓冲的冷冻干燥品。将各标准品溶于0.5mL蒸馏水中。复溶后的标准品必须存放于-18℃以下，且只能冻融两次。准确浓度标在各瓶上。5瓶。

4. 质控品[**CTRL**]

含有合成人骨钙素、蛋白质稳定剂和防腐剂的PBS缓冲的冷冻干燥品。将质控样本溶于0.5mL蒸馏水中。复溶后的质控品必须存放于-18℃以下，且只能冻融两次。请参考所附数据表中质控品的浓度范围。1瓶。

5. 生物素标记骨钙素[**Ag BIOTIN**]

可直接使用的含有生物素标记的合成人类骨钙素的溶液（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**]

中段骨钙素（21-29 位氨基酸）特异性多克隆抗体浓缩溶液（溶于含蛋白质稳定剂和防腐剂的缓冲液）。使用之前按 1：100 的比例与一级孵育缓冲液混合。1瓶，至少 0.5mL。

7. 一级孵育缓冲液[**BUF**]

可直接使用的含蛋白质稳定剂，去污剂和防腐剂的PBS缓冲液，用于稀释第一抗体。1瓶，至少20.0ml。

8. 过氧化物酶偶联抗体[**ENZYMCONJ**]

可直接使用的过氧化物酶偶联的抗鼠IgG抗体。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。

9. 底物溶液（瓶TMB）

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

10. 终止液[**H2SO4**]

可直接使用的0.18mol/L硫酸溶液。1瓶，至少12.0 mL。

11. 冲洗液[**WASHBUF 50×**]

含有去污剂和防腐剂的浓缩清洗缓冲液，用前以1体积浓缩清洗缓冲液+50体积蒸馏水的比例稀释。1瓶，至少20.0mL。

12. 封口膜

孵育时密封微孔板的粘性薄膜。

【储存条件及有效期】

收到试剂盒后应在于 2-8℃保存。试剂在此条件下稳定至包装盒上所标有效日期。

复溶后标准品和质控品应在 -18℃以下存放，且只能冻融两次。当第一抗体和一级孵育缓冲液混合后，剩余混合液在 2-8℃下存放最多 30 天，或在-18℃ 以下冻结。其它剩余试剂以及微孔板应在 2-8℃保存。

【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】

静脉取血样，避免溶血。采样后 3 小时内分离血清。建议立即冷冻样本 ($<-18^{\circ}\text{C}$)。

【检验方法】

打开试剂盒前，请阅读注意事项。本试剂盒提供的试剂足够96个样本的检测。将冷冻干燥的试剂溶解在适量蒸馏水中，混合前放置 10 分钟，避免出现泡沫。

1. 自备材料

- 1) 用以稀释第一抗体溶液和冲洗缓冲液的容器。
- 2) 准确移取20 μL 的微量移液器
- 3) 蒸馏水
- 4) 准确移取100和150 μL 的8通道或12通道微量移液器
- 5) 微孔板混合器 (300rpm)
- 6) 450nm和650nm酶标仪

2. 实验步骤

使用前，将所有溶液平衡至室温。在18-22 $^{\circ}\text{C}$ 下进行实验。

确定实验所需微孔板数量。建议每一样本设两个平行孔。另外，每轮实验共需要14孔用于标准品和质控品。

将适当数量的微孔板置于塑料框架上。将未使用的微孔板与干燥剂一起密封于锡箔袋中。

1) 预孵育

每孔内加入 100 μL 生物素标记的骨钙素 **[Ag BIOTIN]**，用封口膜密封微孔板，于微孔板混合器上 (300rpm) 室温 (18-22 $^{\circ}\text{C}$) 孵育 30 $\pm$ 5 分钟。

2) 洗板

手工洗板：5 次，每次每孔分配 300 μL 洗液；
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

A: 使用前将第一抗体 **[Ab]** 和一级孵育缓冲液 **[BUF]** 按体积比 1: 100 小心混合，防止起泡。

B: 相应孔中分别加入 20 μL 标准品 **[CAL 0-5]**，质控品 **[CTRL]** 和待测样本，再于每孔内加入 150 μL 第一抗体和一级孵育缓冲液的混合液，用封口膜密封微孔板，于微孔板混合器上 (300rpm) 室温 (18-22 $^{\circ}\text{C}$) 孵育 60 $\pm$ 5 分钟。

4) 洗板

见步骤 2)。

5) 二级孵育

所有微孔内加入 100 μL 第二抗体 **[ENZYMCONJ]** 用封口膜密封微孔板，于微孔板混合器上 (300rpm) 室温 (18-22 $^{\circ}\text{C}$) 孵育 60 $\pm$ 5 分钟。

6) 洗板

见步骤 2)。

7) 加入显色底物孵育

每孔内加入 100 μL 底物溶液 **[SUBS TMB]**。用封口膜密封微孔板，于微孔板混合器上 (300rpm) 室温 (18-22

$^{\circ}\text{C}$) 避光孵育 15 $\pm$ 2 分钟。

8) 终止显色反应

每孔内加入 100 μL 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。

质量控制

良好实验室管理规范(GLP)要求在每轮实验中使用质控品以检测实验操作质量。质控品应以待测样本对待，并用适当的统计方法分析结果。

【参考值 (参考范围)】

建议实验室建立自己的预期值范围。3个月大的SPRD雌性大鼠的平均值和标准偏差举例如下。

大鼠种类	年龄 (月)	受检个体数	平均值 ng/mL	标准差(SD) ng/mL	标准误差 (SEM) ng/mL
SPRD	3	30	417.8	83.5	15.3

【检验结果的解释】

可使用四参数对数曲线拟合，也可以计算样本平行孔吸光度的平均值，构建六个标准品 (标准品0-5) 的吸光度平均值 (纵坐标) 对相应骨钙素浓度 (横坐标) 的标准曲线，依此用内推法确定质控品和待测样本中骨钙素的浓度。

结果举例：

项目	骨钙素浓度 (ng/ml)	A ₄₅₀₋₆₅₀ (nm)	A ₄₅₀₋₆₅₀ (nm) 平均值	内推骨钙素浓度 (ng/ml)
标准0	0	1.997/1.991	1.994	
标准1	45.9	1.725/1.756	1.741	
标准2	169.9	1.063/1.030	1.147	
标准3	401.0	0.528/0.502	0.515	
标准4	801.0	0.329/0.320	0.325	
标准5	1510.0	0.191/0.178	0.185	
质控		1.322/1.243	1.262	118.5
样本1		0.263/0.267	0.265	940.2
样本2		0.869/0.922	0.896	211.6
样本3		1.676/1.654	1.665	56.9

注意：以上数据仅为举例，不可用于计算其它实验的结果。

【检验方法的局限性】

如果待测样本的吸光度低于标准品5，建议用含低浓度骨钙素的大鼠血清稀释样本并重新分析。

【产品性能指标】**1. 大鼠骨钙素的交叉反应性：99 $\pm$ 4% (平均值 $\pm$ SD)**

用标准品缓冲液将纯化的大鼠骨钙素稀释2倍后用本试剂盒检测骨钙素浓度。观测到的浓度范围为 48.1-1660ng/mL。按下式计算回收率：观测值/期望值 *100%。

2. 检测极限：50 ng/mL

此值为低于21个空白（骨钙素标准品0）平均值两个标准偏差所对应的浓度。

3. 精确度

大鼠中段骨钙素酶联免疫试剂盒的精确度用三个血清样本进行了评估。按照NCCLS EP5-A方案对每个样本进行连续10轮检验（11）。

结果总结如下：

骨钙素平均值 (ng/mL)	批内CV (%)	批间CV (%)
948	7.7	3.4
215	5.5	5.0
152	6.6	3.6

4. 线性

用大鼠中段骨钙素酶联免疫试剂盒检测大鼠血清样本（已用含较低骨钙素浓度的大鼠血清稀释）。

结果如下表所示：

稀释流程		期望值 ng/mL	观测值 ng/mL	回收率 (%)
高血清 845ng/mL	低血清 292ng/mL			
1	1	569	470	82.6
1	3	430	376	87.4
1	7	305	323	105.9
高血清 593ng/mL	低血清 292ng/mL			
1	1	443	410	92.6
1	3	367	341	92.9
1	7	330	291	88.2

【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. Evaluation of Precision Performance of Clinical Chemistry Devices; Approved Guideline. NCCLS EP5-A Vol.19, No.2, February (1999).
2. Frolik CA. et al., Time-dependent changes in biochemical bone markers and serum cholesterol in ovariectomized rats: effects of raloxifene HCl, tamoxifen, estrogen, and alendronate. *Bone* (1996);18:621-7
3. Gallop PM. et al., Carboxylated calcium-binding proteins and vitamin K. *N Engl J Med*

(1980);302;1460-6.

4. Gaumet N. et al., Influence of ovariectomy and estradiol treatment on calcium homeostasis during aging in rats. *Arch Physiol Biochem* (1997);105;435-44.
5. Hauschka PV. et al., Direct identification of the calcium-binding amino acid, gamma-carboxy-glutamate, in mineralized tissue. *Proc Natl Acad Sci USA* (1975);72;3925-9.
6. Hauschka PV. et al., Osteocalcin and matrix Gla protein: vitamin K-dependent proteins in bone. *Physiol Rev* (1989);69;990-1047.
7. Kasugai Y. et al., Effects of tibolone (Org OD14) treatment for 3 months on ovariectomy-induced osteopenia in 8-month-old rats on a low-calcium diet: preventive testing for 3 months. *Bone* (1998);22;119-24.
- 8.
8. Lepola VT. et al., Bisphosphonates clodronate and etidronate in the prevention of ovariectomy-induced osteopenia in growing rats. *J Bone Miner Res* (1996);11;1508-17.
9. Poser JW. et al., Isolation and sequence of the vitamin K-dependent protein from human bone. Undercarboxylation of the first glutamic acid residue. *J Biol Chem* (1980);255;8685-91
10. Price PA. et al., Characterization of a gamma-carboxyglutamic acid-containing protein from bone. *Proc Natl Acad Sci USA* (1976);73;1447-51.
11. Rosenquist C. et al., Measurement of a more stable region of osteocalcin in serum by ELISA with two monoclonal antibodies. *Clin Chem* (1995);41;1439-45.
12. Seidlova-Wuttke D. et al., Pharmacology of Cimicifuga racemosa extract BNO 1055 in rats: bone, fat and uterus. *Maturitas* (2003);44Suppl1:S39-S50.