

氨基端和中段骨钙素检测试剂盒（酶联免疫法）使用说明书

【产品名称】

通用名称：氨基端和中段骨钙素检测试剂盒（酶联免疫法）

【包装规格】

96人份/盒

【预期用途】

氨基端和中段骨钙素酶联免疫吸附分析试剂盒采用酶联免疫法定量测定人血清和血浆中作为成骨细胞活性指标的骨钙素含量，该项分析可用于骨质疏松的预防。

骨钙素值的变化可取决于人的年龄（绝经年数），生物节律，肾小球的滤清速率和药物治疗持续时间。

本检测结果应该与对患者的临床评估和其它诊断检测所获得的资料结合使用。因此，不推荐将骨钙素值用于总人口中的骨质疏松筛选检测。此外，不应仅根据骨钙素值改变药物剂量或停止用药。当评估后续样本时，应在一天中同一时间采集同类型样本（血清或抗凝血浆）作为基线。

【检测的概述和说明】

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5800道尔顿，含有49个氨基酸，包括三个 γ -羧基谷氨酸残基。

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。骨钙素的确切生理作用仍不清楚。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(1—14)。

已证明血清中骨钙素的测定有助于鉴别妇女发展为骨质疏松的危险，有助于监测绝经前和绝经后，以及抗骨吸收治疗中骨的代谢。

【检验原理】

氨基端和中段骨钙素酶联免疫吸附分析试剂盒是基于运用两种高度特异的抗人骨钙素单克隆抗体(Mabs)。识别骨钙素中部(氨基酸20—29)的生物素标记抗体用于抗原抗体复合物的捕获，识别氨基端(氨基酸10—16)的过氧化物酶偶联抗体用于检测。除完整骨钙素(氨基酸1—49)之外，氨基端-中部片段(氨基酸1—43)也同时被检测。

标准品、质控品和待测样本加入链霉抗生物素蛋白(streptavidin)包被的微孔板中，然后加入生物素标记抗体和过氧化物酶偶联抗体的混合物。室温孵育2小时后清洗微孔板，加入生色底物，加入硫酸终止显色反应。最后测量吸光度。

【主要组成成份】

1.链霉抗生物素蛋白(Streptavidin)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条 x 8孔)，置于一塑料框架中。

2.骨钙素标准品0 **CAL 0**

一瓶含有蛋白质稳定剂和防腐剂的PBS缓冲的冷冻干燥品。溶于5.0毫升蒸馏水中。标准品用后必须存放于-18℃以下。

3.骨钙素标准品1—5 **CAL 1 - 5**

五瓶含有合成人骨钙素、蛋白质稳定剂和防腐剂的PBS缓冲的冷冻干燥品。将各标准品样本溶于0.5mL蒸馏水中。准确浓度标在各瓶上。标准样本用后必须存放于-18℃以下，且只能冻融两次。

4.质控品 **CTRL 1 - 2**

两瓶含有合成人骨钙素、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。质控品用后必须存放于-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。

5.过氧化物酶偶联抗体 **ENZYMCONJ**

一瓶(0.25mL)过氧化物酶偶联的鼠抗骨钙素氨基端特异性单克隆抗体浓缩液(溶于含蛋白质稳定剂，去污剂和防腐剂的TRIS缓冲液中)。使用前加入10mL偶联稀释液。

6.生物素标记抗体 **Ab BIOTIN**

一瓶(0.25mL)生物素标记的鼠抗骨钙素中部的特异性单克隆抗体浓缩液(溶于含蛋白质稳定剂，去污剂和防腐剂的TRIS缓冲液中)。使用前加入10mL偶联稀释液。

7.偶联稀释液 **BUF**

一瓶(至少22 mL)含有蛋白质稳定剂，去污剂和防腐剂的PBS缓冲溶液。

8.底物溶液 **SUBS TMB**

一瓶(至少12 mL)可直接使用的四甲基联苯胺(TMB)底物(溶于酸性缓冲溶液)。请注意该生色底物可带浅蓝色。

9.终止液 **H₂SO₄**

一瓶(至少12 mL)可直接使用的0.18mol/L硫酸溶液。

10.清洗溶液 **WASHBUF 50x**

一瓶(至少20mL)含有去污剂和防腐剂的浓缩清洗缓冲液，用前以1体积浓缩清洗缓冲溶液

+50体积蒸馏水的比例稀释。

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】

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

重新溶解后标准品和质控品应在 -18°C 以下存放，最长存放 3 个月，且只能冻融两次。当抗体试剂混合后，剩余混合物应存放在 2-8°C，存放应不超过 1 个月，或在 -18°C 以下冻结。其它剩余试剂以及微孔板应在 2-8°C 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°C) 当分析血浆样本时，可使用肝素或EDTA抗凝的血浆。

【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。

所需的仪器及试剂(未提供)

- 盛装抗体混合溶液和清洗溶液的容器。
- 准确移取20μL的微量移液器
- 蒸馏水
- 准确移取100和150μL的8通道或12通道微量移液器
- 450nm和650nm酶标仪

实验步骤

为获得最佳实验性能，请按以下说明所示进行实验。

使用前，将所有溶液平衡至室温。在18—22°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. 制备抗体混合溶液:

1) 向过氧化物酶偶联抗体溶液 **ENZYMCONJ** 和生物素标记的抗体溶液 **Ab BIOTIN** 各加入10mL偶联稀释液 **BUF**。

2) 等体积混合两抗体溶液。

2. 微孔板孵育

在适当的孔中分别加入20μL标准品 **CAL 1-5**，质控品 **CTRL 1-2** 和待测样本，再加入150μL抗体混合溶液，用封口膜密封微孔板，在18—22°C温育120±5分钟，不要震荡混合。

3. 清洗微孔板

清洗缓冲溶液 (**WASHBUF 50x**) 以1体积浓缩缓冲溶液+50体积蒸馏水的比例稀释。用稀释的清洗缓冲液手工清洗微孔板5次。使用自动洗板机，请参照产品说明或实验室指南。通常清洗5次。确保每次手工或自动清洗后将微孔板中的溶液倒干净。

4. 与生色底物溶液孵育

向各孔加入100μL底物溶液 **SUBS TMB**，用封口膜密封，在18—22°C且避光的条件下孵育15±2分钟(不要混合震荡)。不要直接从盛TMB底物的小瓶吸取，将所需体积的TMB移入一干净容器中使用。容器中剩余的底物应予以丢弃，不要倒回TMB 瓶中。

5. 终止显色反应

向各孔加入100 μL终止溶液 **H₂SO₄**。

6. 测定吸光度

在2小时内以650nm为参照测定450nm下的吸光度。

检测范围

如果待测样本的吸光度超出标准品5，应该用标准品0稀释样品并重新分析。

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正常值和病理值的范围。各类人群的平均值和标准偏差举例如下。详细内容请参阅参考文献。

人群	人数	骨钙素平均值 (ng/mL)	95%置信区间
绝经前妇女	77	17.4	8.4-33.9
绝经后妇女 ¹⁾	125	26.5	12.8-55.0
男性	85	19.8	9.6-40.8

1) 绝经平均时间为 10.3 年

个体日间差异

评估个体日间差异：分析11名健康绝经妇女两周以上的5个时间点的血清样品(早上空腹)。

样本编号	平均值 (ng/mL)	SD(ng/mL)	CV (%)
------	----------------	-----------	--------

1	22.0	3.5	16
2	13.4	1.0	7
3	19.6	1.3	7
4	18.0	3.1	17
5	12.9	1.1	9
6	9.9	0.9	9
7	14.4	2.2	15
8	7.5	0.4	5
9	15.3	2.2	15
10	14.5	1.6	11
11	14.8	0.6	4

【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

标准品/质控/样本	骨钙素浓度 (ng/ml)	A ₄₅₀ -A ₆₅₀ 吸光度1/吸光度2	A ₄₅₀ -A ₆₅₀ 平均值	内推骨钙素浓度 (ng/ml)
标准品0	0.0	0.019/0.020	0.020	
标准品1	4.2	0.108/0.096	0.102	
标准品2	7.6	0.183/0.177	0.180	
标准品3	19.4	0.627/0.656	0.642	
标准品4	35.4	1.271/1.278	1.275	
标准品5	56.1	1.988/1.873	1.931	
质控品1		0.474/0.459	0.467	15.1
质控品2		1.147/1.132	1.140	31.8
样本I		0.099/0.105	0.102	4.6
样本II		0.899/0.850	0.875	25.1
样本III		1.412/1.375	1.394	38.7

请注意: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】

测试了脂类，胆红素和血红蛋白对用试剂盒检测血清样本中骨钙素的干扰。低于下表所列浓度时未检测到干扰：

- 脂类(内脂) 15 g/L
- 胆红素 200 mg/L
- 血红蛋白 5 g/L

【产品性能指标】

检测限度: 0.5 ng/mL 骨钙素

此值为空白(即骨钙素标准品0) 21个测定的平

均值加三倍标准偏差所对应的浓度。

精确度

试剂盒的精确度用三个血清样本进行了评估。结果总结如下：

批间CV(n=10)

均值(ng/mL)	SD(ng/mL)	CV(%)
6.7	0.2	5.1
26.2	0.7	2.7
53.9	2.3	4.2

批内CV(n=10)

均值(ng/mL)	SD(ng/mL)	批间CV(%)
6.7	0.1	1.3
26.2	0.4	1.8
53.9	1.2	2.2

稀释/线性

实验检测了试剂盒是否对任何影响血清基质的因素敏感。4个血清样本用标准品0稀释后用试剂盒测定骨钙素浓度。

样本	稀释	测定值 (ng/mL)	期望值 (ng/mL)	回收率 (期望值%)
1	1/1	12.0	12.0	100
	1/2	5.1	6.0	84
	1/4	2.7	3.0	88
	1/8			
2	1/1	36.1	36.1	100
	1/2	18.1	18.1	106
	1/4	9.0	9.0	105
	1/8	4.7	4.5	104
3	1/1	38.2	38.2	100
	1/2	20.5	19.1	107
	1/4	9.9	9.6	104
	1/8	4.3	4.8	90
4	1/1	48.1	48.1	100
	1/2	23.8	24.8	99
	1/4	12.2	12.0	101
	1/8	6.3	6.0	105

回收率

将不同量合成骨钙素加入人血清，测定试剂盒的精确度。三个血清样本与5个标准品等体积混合，并用试剂盒进行检测。

样本	标准合成骨钙素 (ng/mL)	测定值 (ng/mL)	期望值 (ng/mL)	回收率 (期望值%)
1	50	26.9	30.5	88
	25	16.4	18.0	91
	12.5	10.7	11.7	92

	6.3	8.4	8.6	98
2	50	30.8	35.6	87
	25	19.9	20.6	97
	12.5	14.6	14.3	102
	6.3	11.0	11.2	98
3	50	37.5	40.5	93
	25	26.6	28.0	95
	12.5	21.2	21.7	98
	6.3	18.6	18.6	100

测量范围

试剂盒的测量范围是 0.5 ng/mL至100 ng/mL骨钙素。

【注意事项】

- 所有试剂和实验室设备应按感染物品处理和丢弃。
- 试剂应在有效期限之内使用，不要将不同批号的试剂混合。

【参考文献】

1. Rosenquist C., Qvist P., Bjarnason N.H., and Christiansen C. 1995. Measurement of a more stable region of osteocalcin in serum by ELISA with two monoclonal antibodies. *Clin Chem* 41, 10:1439-1445
2. Takahashi M, Kushida K, Nagano A, Inoue T. 2000. Comparison of the analytical and clinical performance characteristics of an N-MID versus an intact osteocalcin immunoradiometric assay. *Clin Chim Acta*. 294:67-76
3. Marcus R; Holloway L; Wells B; Greendale G; James MK; Wasilaukas C; Kelaghan J. 1999. The Relationship of Biochemical Markers of Bone Turnover to Bone Density Changes in postmenopausal Women: Results from the Postmenopausal Estrogen/Progestin Interventions (PEPI) Trial. *Journal of Bone and Mineral Research*; 14 p1583-1595
4. McClung M; Clemmesen B; Daifotis A; Gilchrist NL; Eisman JA; Weinstein RS; Fuleihan Ge; Reda C; Yates AJ; Ravn P. 1998. Alendronate Prevents Postmenopausal Bone Loss in Women Without Osteoporosis. A Double-Blind, Randomized, Controlled Trial. Alendronate Osteoporosis Prevention Study Group. *Annals of Internal Medicine*; 128(4) p253-261
5. Meunier P; Confravreux E; Tupinon I; Hardouin C; Delmas PD; Balena R. 1997. Prevention of Early Postmenopausal Bone Loss with Cyclical Etidronate Therapy (A Double-Blind, Placebo-Controlled Study and 1-Year Follow-Up). *Journal of Clinical Endocrinology & Metabolism*; 82 p2784-2791
6. N. H. Bjarnason, K. Bjarnason, J. Haarbo, C. Rosenquist, and C. Christiansen. 1996. Tibolone: Prevention of Bone Loss in Late Postmenopausal Women. *J Clin Endocrinol Metab* 81:2419-2422
7. Ravn P; Clemmesen B; Riis BJ; Christiansen C. 1996. The Effect on Bone Mass and Bone Markers of Different Doses of Ibandronate: A New

8. Bisphosphonate for Prevention and Treatment of Postmenopausal Osteoporosis: A 1-year, Randomized, Double-blind, Placebo-controlled Dose-finding Study. *Bone* 19 p527-533
8. Christiansen, C., L.B. Tanko, L. Warming, A. Moelgaard, S. Christgau, P. Qvist, M. Baumann, L. Wiczorek, and N. Hoyle. 2003. Dose dependent effects on bone resorption and formation of intermittently administered intravenous ibandronate. *Osteoporos Int*
9. Junqueira PA, da Fonseca AM, Bagnoli VR, Giannella-Netot D, Manguiera CL, Coimbra CN, Pinotti JA. 2002. Comparison of bone remodeling indicators in climacteric women. *Int J Fertil Womens Med* 47:174-181
10. Ohishi T, Takahashi M, Kushida K, Hoshino H, Tsuchikawa T, Naitoh K, Inoue T. 1998. Changes of biochemical markers during fracture healing. *Arch Orthop Trauma Surg*. 118:126-130
11. Ravn P, Christensen JO, Baumann M, Clemmesen B. 1998. Changes in biochemical markers and bone mass after withdrawal of ibandronate treatment: prediction of bone mass changes during treatment. *Bone*. 22:559-564
12. Ravn P, Clemmesen B, Christiansen C. 1999. Biochemical markers can predict the response in bone mass during alendronate treatment in early postmenopausal women. Alendronate Osteoporosis Prevention Study Group. *Bone* 24:237-244
13. Ravn P; Rix M; Andreassen H; Clemmesen B; Bidstrup M; Gunnes M. 1997. High bone turnover is associated with low bone mass and spinal fracture in postmenopausal women. *Calcif Tissue Int*. 60:255-260
14. Tanko, L.B., U. Mouritzen, H.J. Lehmann, L. Warming, A. Moelgaard, S. Christgau, P. Qvist, M. Baumann, L. Wiczorek, N. Hoyle, and C. Christiansen. 2003. Oral ibandronate: changes in markers of bone turnover during adequately dosed continuous and weekly therapy and during different suboptimally dosed treatment regimens. *Bone* 32:687-693

【生产企业及售后服务机构】

生产者名称: 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】

国食药监械(进)字2006第3401263号

【产品标准编号】 YZB/ DAM 0135-2006

【说明书批准及修改日期】

仅供参考, 请以原版英文说明书为准!