

艾狄斯™大鼠抗酒石酸酸性磷酸酶5b检测试剂盒（酶联免疫法）使用说明书

货号：SB-TR102

【产品名称】

通用名称：艾狄斯™大鼠抗酒石酸酸性磷酸酶 5b 检测试剂盒（酶联免疫法）

英文名称：RatTRAP™ Assay kit（ELISA）

【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，用于大鼠血清中抗酒石酸酸性磷酸酶5b（TRAP5b）的定量测定。仅适用于科研，不用于体外诊断。

【概要说明】

大量的抗酒石酸酸性磷酸酶（TRACP）是由骨吸收的破骨细胞和有活力的巨噬细胞所释放的（1）。在血液循环中的 TRACP 有 TRACP 5b 和 TRACP 5a 二种形式（2），TRACP 5b 来源于破骨细胞，而 TRACP 5a 来源于巨噬细胞（3，4）。由破骨细胞刚分泌到血液中的 TRACP 5b 是有活性的酶，但当 TRACP 5b 在血液循环中被清除之前已无活性，并被降解为碎片。这样 TRACP 5b 不会因肝、肾功能受损而在血液中积蓄（5，6）。血清中 TRACP 5b 在昼夜间的活性水平变化不明显，且不受进食的影响，故一天的任何时候都可以采集样本进行检验（6）。近来的研究表明，TRACP 5b 更能够反映破骨细胞的数量而不是其活性（7-10）。

RatTRAP™分析方法是检测大鼠血清样本中TRACP 5b活性的特异性方法（8）。鉴于所使用动物的种属，性别和年龄均会影响到检测结果，每个实验室应确立自己的参考值范围。大鼠卵巢切除（OVX）模型和睾丸切除（ORX）模型为常用的骨质疏松实验动物模型。在这两个模型中，分别于实验前和实验中的第7，14和28天对 TRACP 5b 水平进行检测。在长期实验中则每月检测一次。大鼠切除卵巢或睾丸后造成骨质流失，骨组织（N.Oc/T.Ar）中的破骨细胞总数经组织形态学检查是下降的，反映破骨细胞数量的血清TRACP 5b值也应该是降低的（8，11）。

RatTRAP™分析方法也可用于检测大鼠破骨细胞体外培养的细胞溶解液或培养基中TRACP 5b活性。由于TRACP 5b的分泌量反映了破骨细胞的数量，通过检测破骨细胞培养基中的TRACP 5b值可以代替显微镜计数（7），血清TRACP 5b值可以代替组织学检测对大鼠骨组织中破骨细胞数量进行评估（8，11）。

【检验原理】

RatTRAP™使用一个高特异性的单克隆抗体，该抗体以杆状病毒激发的重组大鼠 TRACP 作为抗原产生的。在检测中，该单克隆抗体在抗-鼠 IgG 包被的微孔内孵育。洗涤之后，标准品，质控品和血清样本在微孔内孵育，通过底物显色判定结合的 TRACP 5b 活性。加入终止液终止反应后，在酶标仪上读取吸光度，颜色的亮度与样本中 TRACP 5b 的活性成正比。

【主要组成成份】

1. **MICROPLAT**-抗体包被的微孔板（**REF** SB-TR102 02W）：

多克隆抗-小鼠IgG包被的聚苯乙烯微孔板（8条×12孔），置于带有干燥剂的包装袋中。

2. **CAL | 1-4**-标准品（**REF** SB-TR102 01A - SB-TR102 01D）：

Tris-缓冲盐冻干粉，包含重组RatTRAP，蛋白质和0.09%叠氮化钠。标准品的准确值标于瓶子标签上。每瓶0.5 mL，每盒4瓶。

3. **Ab**- 抗-大鼠TRAP抗体（**REF** SB-TR102 02）：

Tris-缓冲盐冻干粉，包含抗-大鼠TRAP抗体，蛋白质，稳定剂和0.05%叠氮化钠。

4. **CTRL**- 质控（**REF** SB-TR102 05）：

Tris-缓冲盐冻干粉，包含重组RatTRAP，蛋白质和0.09%叠氮化钠。质控品的准确值标于瓶子标签上，每瓶0.5 mL。

5. **NaOH**- 终止液（**REF** SB-TR000 06）：

0.32M氢氧化钠，每瓶6 mL。

6. **RELEASREAG**- 释放剂（**REF** SB-TR102 07）：

从结合蛋白中分离TRAP的特定试剂。每瓶6 mL。

7. **SUBS | pNPP**- 底物片（**REF** SB-TR000 08）：

pNPP 2片。

8. **SUBSBUF**- 底物缓冲液（**REF** SB-TR000 08B）：

醋酸钠缓冲液，每瓶10 mL。

9. **WASHBUF | 25x**- 浓缩冲洗缓冲液（**REF** SB-TR000 09）：

Tris-缓冲盐，包含吐温-20，每瓶40 mL。

10. 封板膜

【储存条件及有效期】

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

复溶后的标准品和质控品应冰冻保存（-70℃ 下保存超过一周）。

【适用仪器】

适用于具有 405nm 波长的所有全自动、半自动酶标仪。

【样本要求】

使用血清样本。采样后立即分离血清。-80℃ 下长期保存。避免反复冻融。

【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) 0.9%NaCl

2) 移液器（20μL，25μL，50μL，100μL，500μL，

5mL)

- 3) 多道移液器 (25 μ L, 50 μ L, 100 μ L)
- 4) 自动洗板机 (可选择)
- 5) 酶标仪

2. 试剂准备

1) **标准品****CAL 1-4**和**质控品****CTRL** : 用0.5ml的蒸馏水或者去离子水复溶, 盖上盖子, 在室温下静置10-15分钟, 反复颠倒几次确保复溶完全。

2) **抗-鼠TRAP抗体**: 用10.5mL的蒸馏水或去离子水复溶, 盖上盖子, 在室温下静置15分钟, 反复颠倒几次确保复溶完全。

3) **底物溶液**: 使用之前准备。二片底物 **SUBS | pNPP** 用 10ml 底物缓冲液溶解 (一片用半瓶 5ml 溶解)。如果多次使用底物溶液, 应避光冰冻保存。

4) **冲洗缓冲液**: 每瓶浓缩洗液**WASHBUF | 25x**加入到960ml的蒸馏水或去离子水溶解并混匀。

所有其他试剂可直接使用。

3. 实验步骤

使用前将所有试剂平衡至室温, 遵照“试剂准备”所述准备好试剂。

打开微孔板包装袋 (保留包装袋上的说明书), 取出所需板条放在板框中。未用完的板条放回包装袋, 和干燥剂一起密封保存并重新标记。为确保能在30分钟内处理完, 不要一次性取出太多的板条。**注意: 确保保存时包装袋是密封状态!**

1) 取**100 μ L**抗-RatTRAP抗体**Ab**加入到微孔板**MICROPLAT**的相应微孔内。

2) 室温(20-24 $^{\circ}$ C)下振荡(大约950rpm)孵育60分钟。

3) 用冲洗液清洗所有微孔4次:

a) 自动洗板: 设定每个孔至少300 μ L的冲洗量, 注入冲洗液后吸干, 重复3次。

b) 手工洗板: 快速颠倒板架倒出孔内液体, 加入250 μ L冲洗液后倒出, 重复三次。

在进行下一步操作前, 将微孔板颠倒在滤纸上轻轻敲打, 以确保除去孔内多余的冲洗液。

4) 每个标准品**CAL**和质控品**CTRL**各取**100 μ L**加入到相应微孔中, 双份检测。以0.9%的NaCl溶液作为空白对照。

5) 取**75 μ L** 0.9% NaCl和**25 μ L** 样本加入到相应微孔中, 双份检测。

6) 用多道移液器取**50 μ L**释放剂**RELEASREAG**加入到所有微孔中。

7) 室温下(20-24 $^{\circ}$ C)振荡(大约950rpm)孵育60分钟。

8) 重复步骤3)。

9) 用多道移液器取**100 μ L**新鲜配置的底物溶液加入到所有微孔中。

10) 用封板膜覆盖板, 在37 $^{\circ}$ C下孵育60分钟。

11) 用多道移液器取**25 μ L**终止液**NaOH** 加入到所有微

孔中, 确保孔内溶液混匀。

12) 加入终止液后的30分钟内, 使用酶标仪在405 nm处测量每个孔的吸光度。

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, 遵照检测说明书得出正确的质控结果。

【参考值 (参考范围)】

建议实验室建立自己的参考值范围。

【检验结果的解释】

在半对数图纸上构建标准品 (1-4) 的吸光度平均值 (纵坐标) 对相应RatTRAP浓度 (横坐标) 的标准曲线, 依据标准曲线和稀释倍数确定质控品和待测样本中RatTRAP浓度值。

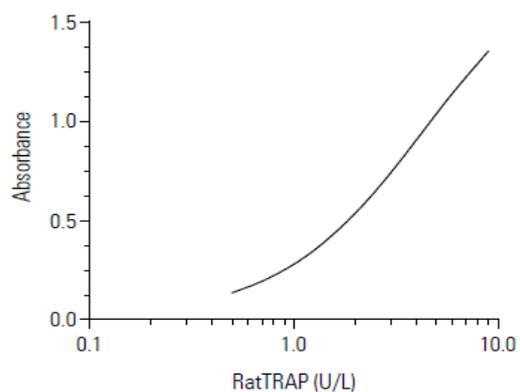
为获得每个样本的RatTRAP浓度, 将标准曲线上的读取值乘以稀释倍数4 (1: 4)。如果加入的样本量为20 μ L而0.9%NaCl为80 μ L, 则稀释倍数为5。

数据举例:

孔号	描述	吸光度	平均吸光度	平均吸光度-空白	结果 U/L
A1, A2	空白	0.190 0.189	0.190	-	
A3, A4	标准品1 0.5 U/L	0.326 0.327	0.326	0.137	
A5, A6	标准品2 1.5 U/L	0.602 0.606	0.604	0.414	
A7, A8	标准品3 3.0 U/L	0.928 0.935	0.931	0.742	
A9, A10	标准品4 9.0 U/L	1.515 1.572	1.543	1.354	
A11, A12	样本	0.703 0.692	0.697	0.508	1.9

注意: 以上数据仅为举例, 不可用于计算其它实验的结果。

典型标准曲线举例:



【检验方法的局限性】

如果待测样本的吸光度高于标准品4，应调整稀释倍数并重新分析。

【产品性能指标】

1. 精确度

	样本	检测份数	平均值 U/L	CV%
批内分析	1	10	1.19	5.8
	2	10	2.42	3.5
	3	10	2.72	4.1
	4	10	6.15	5.2
	5	10	10.32	3.9
批间分析	1	8	1.24	5.2
	2	8	2.42	3.2
	3	8	2.70	3.0
	4	8	5.99	3.9

2. 回收率

向已知RatTRAP浓度的大鼠血清样本中加入不同浓度的RatTRAP，再用本试剂盒检测，得出平均回收率为99%（范围92-105%）。

3. 灵敏度

16份空白对照的平均光密度值加上2个标准差所对应的浓度即为灵敏度。灵敏度为0.1 U/L。

【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. 试剂应避免阳光直射。
3. 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。
4. 不要使用已经过期的试剂，不同批号的试剂不能混用。
5. 试剂盒内的一些试剂包含作为防腐剂的叠氮化钠，它可与铝、铜或者黄铜铝制品形成高爆炸性的金属叠氮物。在处理时，应用大量的水冲洗以防止生成金属叠氮物。
6. 终止液包含 0.32M 的氢氧化钠；
R36/38 刺激眼睛和皮肤；
S26 如果接触到眼睛，立即用大量水冲洗并咨询医生；
S37/39 穿戴适当的手套和眼睛/面部的防护罩

【参考文献】

- 1 Yaziji H, Janckila AJ, Lear SC, Martin AW, Yam LT 1995 Immunohistochemical detection of tartrate-resistant acid phosphatase in non-hematopoietic human tissues. Am J Clin Pathol 104:397-402.
- 2 Lam KW, Li CY, Yam LT, Desnick RJ 1981 Comparison of the tartrate-resistant acid phosphatase in Gaucher's disease and leukemic reticuloendotheliosis. Clin Biochem 14:177-181.
- 3 Halleen JM, Alatalo SL, Suominen H, Cheng S, Janckila AJ, Väänänen HK 2000 Tartrate-resistant acid phosphatase 5b: a novel serum marker of bone resorption. J Bone Miner Res 15:1337-1345.

- 4 Janckila AJ, Neustadt DH, Nakasato YR, Halleen JM, Hentunen T, Yam LT 2002 Serum tartrate-resistant acid phosphatase isoforms in rheumatoid arthritis. Clin Chim Acta. 320:49-58.
- 5 Halleen JM, Alatalo SL, Janckila AJ, Woitge HW, Seibel MJ, Väänänen HK 2001 Serum Tartrate-resistant acid phosphatase is a specific and sensitive marker of bone resorption. Clin Chem 47:597-600.
- 6 Hannon RA, Clowes JA, Eagleton AC, Al Hadari AA, Eastell R, Blumsohn A 2004 Clinical performance of immunoreactive tartrate resistant acid phosphatase isoform 5b as a marker of bone resorption. Bone 34:187-194.
- 7 Alatalo SL, Halleen JM, Hentunen TA, Mönkkönen J, Väänänen HK 2000 Rapid screening method for osteoclast differentiation in vitro that measures tartrate-resistant acid phosphatase 5b activity secreted into the culture medium. Clin Chem 46:1751-1754.
- 8 Alatalo SL, Peng Z, Janckila AJ, Kaija H, Vihko P, Väänänen HK, Halleen JM 2003 A novel immunoassay for the determination of tartrate-resistant acid phosphatase 5b from rat serum. J Bone Miner Res 18:134-139.
- 9 Chu P, Chao TY, Lin YF, Janckila AJ, Yam LT 2003 Correlation between histomorphometric parameters of bone resorption and serum type 5b tartrate-resistant acid phosphatase in uremic patients on maintenance hemodialysis. Am J Kidney Dis 41:1052-1059.
- 10 Alatalo SL, Ivaska KK, Waguespack SG, Econs MJ, Väänänen HK, Halleen JM 2004 Osteoclast-derived serum tartrate-resistant acid phosphatase 5b in Albers-Schonberg disease (type II autosomal dominant osteopetrosis). Clin Chem 50:883-890.
- 11 Rissanen JP, Suominen MI, Oksala R, Ravanti L, Kallio P, Halleen JM 2006 The ratio of osteoclast activity/osteoclast number (CTX/TRACP 5b) is a useful parameter in experimental rat models of osteoporosis. J Bone Miner Res 21 (Suppl 1):Abstract SU105.
- 12 Kaija H, Jia J, Lindqvist Y, Andersson G, Vihko P 1999 Tartrate-resistant bone acid phosphatase: large scale purification of the recombinant enzyme, characterization and crystallization. J Bone Miner Res 14:424-430.

【生产企业】

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

联系方式：+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】

仅供参考，请以原版英文说明书为准！