

# 大/小鼠 I 型原胶原 N 端前肽 (PINP) 检测试剂盒 (酶联免疫法) 说明书

货号: AC-33F1

## 【产品名称】

通用名称: 大/小鼠 I 型原胶原 N 端前肽 (PINP) 检测试剂盒 (酶联免疫法)

英文名称: Rat/Mouse PINP EIA

## 【包装规格】

96 人份/盒

## 【预期用途】

本试剂盒应用竞争性酶联免疫分析方法, 用于定量测定大/小鼠血清或血浆样本中 I 型原胶原 N 端前肽 (PINP)。仅用于科研, 不用于医学诊断。

## 【概要说明】

骨形成过程中的一个重要步骤是合成 I 型胶原——骨基质中的主要有机成分。在胶原的合成过程中, 原胶原分子的氨基端和碳端会释放出前肽 (1)。这些前肽分泌进入血液循环, 并且其在人血清中的免疫测定已经获得商业应用。I 型原胶原氨基端前肽 (PINP) 可能是最特异最灵敏的骨形成标志物 (2)。PINP 不仅是监测应用合成代谢药物治疗骨质疏松症功效的特别有用的标志物, 而且也是监测抗骨吸收治疗功效的最佳骨转换标志物之一 (4,5)。

大/小鼠 PINP 测定是测定大/小鼠骨胶原合成过程中释放的 PINP 水平的特异性方法, 并且与人 PINP 无交叉反应。其结果可用于判定大/小鼠血清样本和成骨细胞培养基中的骨形成速率。研究表明, 成骨细胞经过体外 BMP-4 和雌激素刺激后, PINP 分泌量上升 (6)。用 PTH 治疗卵巢切除后的幼龄大鼠和完整的老龄大鼠后, PINP 值也会升高 (7)。

## 【检验原理】

IDS 大/小鼠 PINP 酶免试剂盒采用竞争性酶联免疫方法, 采用兔抗 PINP 多克隆抗体包被至聚苯乙烯微孔板的微孔内表面。标准品、质控品和样本加入到微孔后, 再加入生物素标记的 PINP, 然后室温下孵育 1 小时, 接着吸出孔内液体并进行洗涤。之后加入辣根过氧化物酶标记的抗生物素蛋白, 其与生物素复合体特异性结合, 再次洗涤后加入显色底物 (TMB) 进行显色。将加入了终止液的混合液体置于酶标仪上读取吸光度, 颜色强度与 PINP 浓度成反比。

## 【主要组成成分】

### 1. **CAL** 0-5-标准品 (**REF**AC-3301A-AC-3301F):

含有大/小鼠 PINP、小鼠血清, 山羊血清, 牛血清白蛋白 (BSA) 和叠氮化钠 (<1%, 复溶后为 0.025%) 的冻干磷酸缓冲盐。每瓶标准品的准确值标于瓶子的标签上, 每瓶 0.5ml。

### 2. **MICROPLAT**- 包被抗体的酶标板 (**REF**AC-3302W):

孔内包被兔抗-PINP 多克隆抗体, 酶标板 12×8 孔条, 包装于带干燥剂的箔袋中。

### 3. **PINP BIOTIN**-PINP 生物素 (**REF**AC-3303):

含有生物素标记的 PINP 和牛血清白蛋白 (BSA) 的冻干磷酸缓冲盐, 每瓶 1 ml。

### 4. **ENZYMCONJ**-酶结合物 (**REF**AC-3304):

含辣根过氧化物酶标记的抗生物素蛋白、蛋白质、酶稳定剂和防腐剂的磷酸盐缓冲液。每瓶 18 ml。

### 5. **CTRL**1-质控品 1 (**REF**AC-3305A):

稀释于含有牛血清白蛋白 (BSA) 和叠氮化钠 (<1%, 复溶后为 0.025%) 的磷酸盐缓冲液 (PBS) 的大鼠血清, 以冻干粉形式提供。每瓶 0.5ml。

### 6. **CTRL**2-质控品 2 (**REF**AC-3305B):

稀释于含有牛血清白蛋白 (BSA) 和叠氮化钠 (<1%, 复溶后为 0.025%) 的磷酸盐缓冲液 (PBS) 的小鼠血清, 以冻干粉形式提供。每瓶 0.5ml。

### 7. **TMB**-TMB 底物 (**REF**AC-TMB):

含有四甲基联苯胺 (TMB) 和过氧化氢的溶液, 每瓶 24 ml。

### 8. **HCL**-终止液 (**REF**AC-STOP):

0.5M 的氢氯酸, 每瓶 14 ml。

### 9. **SAMPDII**-样本稀释液 (**REF**AC-3309):

含有牛血清白蛋白 (BSA) 和 0.05% 叠氮化钠的磷酸盐缓冲液。每瓶 20ml。

### 10. **WASHBUF 20x**-浓缩冲洗液 (**REF**AC-WASHL):

含有吐温的磷酸盐缓冲液, 每瓶 50ml。

### 11. 封板膜: 8 个/盒。

## 【储存条件及有效期】

试剂在 2-8℃ 下保存可稳定至所标示的有效期。

复溶的标准品 (CAL), 质控品 (CTRL) 在 -20℃ 下可保存 8 周。复溶的 PINP 生物素 (PINP BIOTIN) 在 2-8℃ 下可保存 8 周。

未使用完的包被抗体的酶标板条应放回至有干燥剂的箔袋中, 将箔袋折好并密封于塑料封口袋中, 2-8℃ 下可保存 8 周。

冲洗液可在室温下保存长达 8 周。

试剂可能变坏的现象:

- 任何一个试剂中有反常微粒子出现。
- 校准品 0 吸光率下降。
- 曲线范围偏离正常位置。

## 【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】

采用血清或血浆 (EDTA 或肝素) 样本。样本收集后应尽快分离, 长期储存需置于 -20℃ 下, 避免样本反复冻融。整个实验应使用相同的样本类型。

## 【检验方法】

### 1. 自备材料:

- 1) 可移取 5μL, 45μL 和 50μL 的高精度移液器。
- 2) 可移取 45μL, 50μL 和 150μL 的高精度多道移液器。
- 3) 酶标板振荡器。
- 4) 自动洗板机 (可选择)。
- 5) 酶标仪和数据分析装置。

### 2. 试剂准备:

#### 1) 标准品 (CAL) 与质控品 (CTRL):

标准品与质控品以冻干品的形式提供。将其复溶在 0.5ml 蒸馏水或去离子水中, 盖好盖子室温下放置 5-10 分钟, 倒转几次确保充分复溶。

如果标准品与质控品要分几次使用, 复溶后应立即将其冷冻于 -20℃ 下。再次使用时, 于室温下解冻, 在解冻完成的 15 分钟内混合均匀后使用。

#### 2) PINP 生物素 (PINP BIOTIN):

以冻干品形式提供。将其复溶于 8ml 样本稀释液 (SAMPDIL) 中, 盖好盖子室温下放置 5-10 分钟, 倒转几次使其充分复溶。

3) 冲洗液 (WASHBUF 20x):

每瓶冲洗浓缩液 (WASHBUF 20x) 加入至 950ml 蒸馏水或去离子水中混匀, 室温下保存。

所有其他试剂可直接使用。

检测前应将所有试剂恢复至室温, 反复倒转使其混合均匀。

3. 操作步骤:

1) 加入 50μl 校准品、质控品于相应的酶标板 MICROPLATE 微孔内, 每个做双孔。

2) 加入 5μl 样本和 45μl 样本稀释液 SAMPDIL 于相应的酶标板 MICROPLATE 微孔内, 每个做双孔。

注: 上述每一步操作应在 15 分钟内完成以减少误差。

3) 采用多道移液器移取 50μl PINP 生物素 PINP BIOTIN 加入至每个微孔内。

4) 盖上车盖在酶标板振荡器 (500-700rpm) 上于 18-30°C 下孵育 1 小时。

5) 用稀释好的冲洗缓冲液洗板 3 次。

a) 自动洗板: 设置洗板机分配每孔至少 300μl 冲洗液。重复洗 3 次。

b) 手工洗板: 迅速颠倒倒出孔内物。每孔加入 250μl 冲洗液。再重复洗板 2 次。

在进入下一步之前, 于吸水纸上用力拍打倒置的板以去除多余的冲洗液。

6) 用多道移液器向所有微孔内加入 150μl 的酶结合物 ENZYMCNJ。

7) 盖上车盖于 18-30°C 下孵育 30 分钟。

8) 重复步骤 5)。

9) 用多道移液器于每孔内加入 150μl TMB 底物 SUBS。

注: TMB 底物溶液易受到污染。仅移取检测所需要的量, 丢弃没用完的 TMB 底物, 请勿再倒回瓶内。

10) 盖上车盖于 18-30°C 下孵育 30 分钟。

11) 用多道移液器于每孔内加入 50μl 终止液 HCL。

12) 加入终止液后的 30 分钟内在酶标仪 450nm (参考 650nm) 波长处读取吸光率。

【参考值 (参考范围)】

目前尚没有明确的参考范围, 各实验室应根据情况确定自己的范围。

【检验结果的解释】

绘制标准曲线: 计算每个标准品、质控品和待测样品的平均吸光率, 以吸光率为纵坐标, PINP 浓度为横坐标, 在半对数坐标纸上绘出一条标准曲线。从标准曲线上找对应的 PINP 浓度值 (ng/ml)。

为获得每个样本的 PINP 浓度, 由曲线读出的值乘以稀释因子 (x10)。

可采用选择性数据压缩技术, 但是应确认所选择的曲线是合适的且能提供满意的结果。推荐 4PL 曲线。

IDS 使用 MultiCalc (PerkinElmer) 数据压缩软件在描点 (吸光率对浓度对数值) 基础上进行 4PL 曲线拟合。

样本测定数据

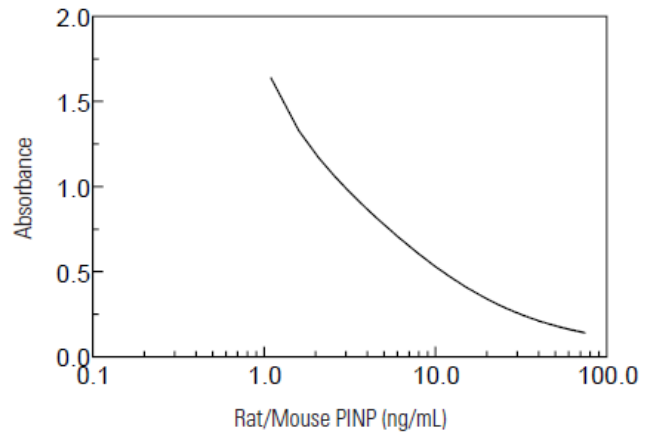
数据只作例证不能作为任何样本结果的计算。

孔号	项目	吸光率	平均吸光率	%B/B <sub>0</sub>	结果 ng/mL	正确值 (x10)

						ng/mL
A1,A2	标准品 0 0ng/mL	2.186 2.236	2.211	100		
B1,B2	标准品 1 1.1ng/mL	1.647, 1.629	1.638	74.1		
C1,C2	标准品 2 2.7ng/mL	1.031, 1.048	1.040	47.0		
D1,D2	标准品 3 9.2ng/mL	0.569, 0.546	0.558	25.2		
E1,E2	标准品 4 30.3ng/mL	0.263, 0.255	0.259	11.7		
F1,F2	标准品 5 74.4ng/mL	0.144, 0.140	0.142	6.4		
G1,G2	样本 1	0.884, 0.874	0.879	39.8	3.8	38
H1,H2	样本 2	0.178, 0.163	0.171	7.7	57.7	577

典型标准曲线

该曲线只作例证, 不作为任何样本结果的计算。



【检验方法的局限性】

经检验证实, 下列物质在此浓度以下时不会对本测试有干扰:

血红蛋白 500 mg/dL

【产品性能指标】

1. 灵敏度

灵敏度 (20 份标准品 0 的平均吸光度减去两个标准偏差 SD 后的对应浓度) 为 0.7ng/mL (7ng/mL 血清)。

2. 精密度

批内测定 均 值 (ng/mL)	n=20 %CV	批间测定 均 值 (ng/mL)	n=68 %CV
40	6.4	37	9.2
177	7.4	178	8.0
550	5.0	577	8.2

3. 回收率

在测定前, 通过在样本中加入 PINP 来评估回收率。

样本浓 度 ng/ml	小 鼠 PINP	检测值 ng/ml	回收 ng/ml	回收率 %

	ng/ml			
69.5	100	153.7	84.2	84.2
69.5	400	506.4	436.9	109.2
			均值	96.7

#### 4. 线性

用低浓度样品稀释高浓度样品以评估线性。

样本	检测值 ng/ml	期望值 ng/ml	% M/E
Low(L)	50		
0.875L+0.125H	93	106	88.1
0.750L+0.250H	144	163	88.5
0.625L+0.375H	210	219	96.0
0.500L+0.500H	280	276	101.7
0.375L+0.625H	298	332	89.9
0.250L+0.750H	356	389	92.1
0.125L+0.875H	446	445	100.1
High (H)	502		
		均值	93.8

#### 5. 特异性

用以下分析物评估抗血清的特异性。

分析物	交叉反应
小鼠PINP	100%
大鼠PINP	100%
人PINP(200ng/mL)	未检测出
人PIIINP(20ng/mL)	未检测出
大鼠PIIINP(10, 000ng/mL)	未检测出

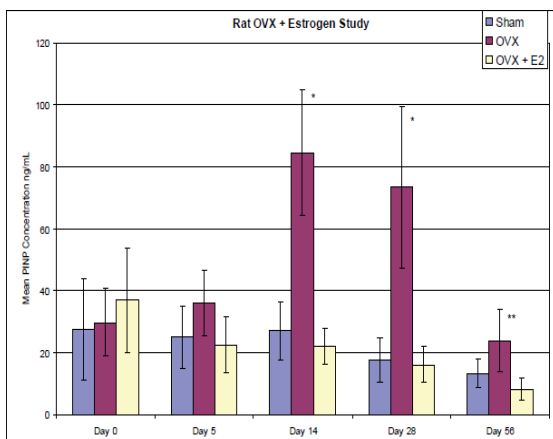
#### 【实验举例】

3 月龄雌性大鼠 (Sprague-Dawley) 随机分成三组:

- (1) 假手术组 (n=12), (2) 卵巢切除术组 (OVX) (n=12), (3) 卵巢切除后皮下植入 17 $\beta$ -雌二醇小球组 (10 $\mu$ g/kg/天) (OVX+EE) (n=12)

分别于手术前禁食过夜后及手术后的第 5、14、28、56 天收集血清样本, 用大小鼠 PINP 酶免试剂盒对其进行检测。

结论: 通过使用大小鼠 PINP 酶免试剂盒测定血清 PINP 水平, 可检测到大鼠卵巢切除术诱发的骨吸收和骨形成方面的变化。



#### 【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。
3. 0.5M 盐酸。终止液含有 0.5M 的盐酸。R36/38 刺激眼睛和皮肤  
S26 一旦触及眼睛, 立即用大量水冲洗并咨询医生  
S36/37 穿戴保护性衣服和手套
4. 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 穿戴保护性衣服和手套。
5. 叠氮化钠  
标准品 (CAL) 和质控品 (CTRL) 中含有叠氮化钠 (NaN<sub>3</sub>) > 0.1% (w/w) < 1%。  
R22 吞食有害  
R52/53 对水生生物有害, 可能对水生环境造成长期负面影响。  
S46 如误食请带上容器或标签直接咨询医生。  
S36/37 穿戴保护性衣服和手套。  
S60 该材料与/或其容器须按危险废弃物处置。
6. 试剂盒中的某些试剂以叠氮化钠作为防腐剂, 可与铅、铜或黄铜反应形成高爆炸性的金属叠氮化合物, 处理时应用大量的水进行冲洗, 避免形成叠氮化合物。

#### 【参考文献】

1. Risteli J, Risteli L 2006 Products of bone collagen metabolism. In: Seibel MJ, Robins SP, Bilezikian JP, editors. Dynamics of bone and cartilage metabolism. Principles and clinical applications, second edition. London: Academic Press. p. 391-405.
2. Melkko J, Kauppila S, Niemi S, Risteli L, Haukipuro K, Jukkola A, Risteli J 1996 Immunoassay for intact aminoterminal propeptide of human type I procollagen. Clin Chem 42:947-954.
3. Chen P, Satterwhite JH, Licata AA, Lewiecki EM, Sipos AA, Misurski DM, Wagman RB 2005 Early changes in biochemical markers of bone formation predict BMD response to teriparatide in postmenopausal women with osteoporosis. J Bone Miner Res 20:962-970.
4. Finkelstein JS, Leder BZ, Burnett SA, Wyland JJ, Lee H, De la Paz AV, Gibson K, Neer RM 2006 Effects of teriparatide, alendronate, or both on bone turnover in osteoporotic men. J Clin Endocrinol

Metab 91:2882-2887.

5. Nenonen A, Cheng S, Ivaska KK, Alatalo SL, Lehtimäki T, Schmidt-Gayk H, Uusi-Rasi K, Heinonen A, Kannus P, Sievänen H, Vuori I, Väänänen HK, Halleen JM 2005 Serum TRACP 5b is a useful marker for monitoring alendronate treatment: comparison with other markers of bone turnover. J Bone Miner Res 20:1804-1812.
6. Parikka V, Peng Z, Hentunen T, Risteli J, Elo T, Väänänen HK, Härkönen P 2005 Estrogen responsiveness of bone formation in vitro and altered bone phenotype in aged estrogen receptor-deficient male and female mice. Eur J Endocrinol 152:301-314.
7. Hale LV, Sells Galvin RJ, Risteli J, Ma YL, Harvey AK, Yang X, Cain RL, Zeng Q, Frolik CA, Sato M, Schmidt AL, Geiser AG 2007 PINP: A serum biomarker of bone formation in the rat. Bone, in press.

【生产企业与售后服务机构】

生产者名称: 英国 Immunodiagnostic Systems Limited

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】2007 年 11 月 12 日

*仅供参考, 请以原版英文说明书为准*