

Code No. MK118

研究用

Takara

Undercarboxylated Osteocalcin
(Glu-OC) EIA Kit

说明书

目 录

内 容	页 码
● 制品说明	1
● 使用目的	1
● 原 理	1
● 制品内容	2
● 试剂盒外所需主要试剂及器材	2
● 保 存	2
● 使用注意事项	2
● 使用方法	2
● 特 点	3
● 性 能	4
● 关联产品	10
● 参考文献	11
● 使用方法概述	11

● 制品说明

骨钙素 (Osteocalcin: OC, 也称为骨钙蛋白 BGP) 是分子量约为 5.9 kDa 的维生素 K (49 个氨基酸) 依赖性骨蛋白。羧化骨钙素 (Gla-OC) 可与钙离子结合形成有活性的蛋白质, 而脱羧基骨钙素没有活性。Gla-OC 中含有 3 个 γ -羧谷氨酸残基 (Gla) 分别在 17、21、24¹⁾ 位点, 这是介导羟基磷灰石强结合的位点。

骨钙素 (OC) 的合成依赖于维生素 D 和 K。维生素 D 诱导 OC 合成, 维生素 K 对 γ -羧谷氨酸残基起刺激作用。在骨钙素再吸收的过程中, 结合于骨质中的脱羧基骨钙素 (Glu-OC) 含量降低, 导致血液和尿液中的 Glu-OC 水平升高。

P. D. Delmas 及同事已证明, 脱羧基骨钙素 (Glu-OC) 含量在年纪大的女性体内明显升高, 表明 OC 的 γ -羧化有依赖年龄性损伤²⁾。血清中脱羧基骨钙素的存在与骨基质的改变和脆弱性的提高有关³⁾。血清中脱羧基骨钙素的常规检测采用的是放射免疫检测羟基磷灰石⁴⁾。本制品应用两种单克隆抗体, 高效作用于脱羧基骨钙素; 其中一种抗体包被于检测板上, 另一种连接过氧化物酶。使用本制品可直接测定 Glu-OC, 不必采用放射免疫检测法来获得准确的骨代谢数据。而且, 本制品可与 Gla-Type Osteocalcin (Gla-OC) EIA Kit (Code No. MK111) 结合使用, 以获得更完整的骨代谢数据。

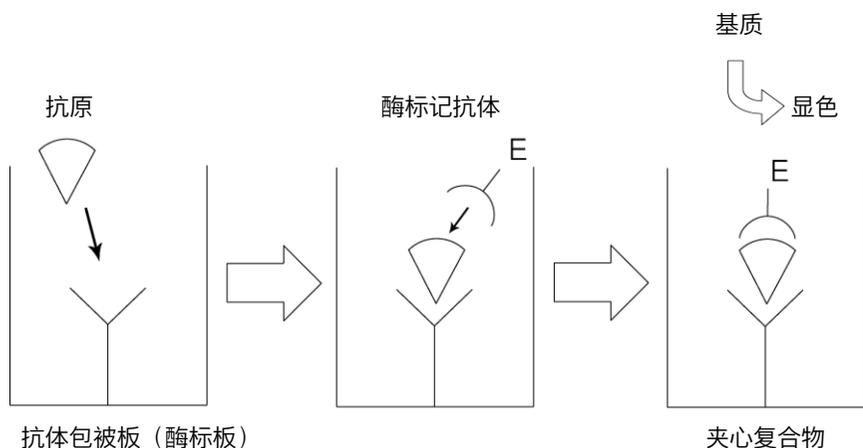
● 使用目的

本制品是体外酶免疫分析 (EIA) 试剂盒, 目的在于定量检测人、牛、兔、猪、山羊、绵羊和猴的血清、血浆、尿液、细胞培养上清液和细胞提取物中的脱羧骨钙素 (Glu-OC) 含量。

本制品仅用于科研目的, 不可用于诊断或医疗应用。

● 检测原理

本制品是固相双层夹心的 EIA 试剂盒, 应用两种鼠源单克隆 OC 抗体, 其中一种抗体连接于检测板上, 另一种连接过氧化物酶。第一步, 将样品和 Standard 添加到每个反应孔中, 通过结合 anti-Glu-OC 单克隆抗体连接到抗体包被板上。第二步, 清洗平板后添加 POD 标记的 anti-OC 单抗。在保温过程中, Glu-OC 一端连接 anti-Glu-OC 抗体, 另一端连接 HRP 标记的单抗。通过在反应液中添加 POD 底物 3,3',5,5'-tetramethylbenzidine 来检测 Glu-OC, 样品和标准品中 Glu-OC 含量成比例显色。使用酶标仪读取吸光度值对 Glu-OC 进行定量, 样品中 Glu-OC 的准确浓度可以通过比较标准品的吸光度值来获得。



● 制品内容

(1) Antibody Coated Microtiterplate (96 well : 8 well × 12 strips) Anti-Glu-OC 单抗的包被板	1 plate
(2) Antibody-POD Conjugate (Lyophilized) 含冻干的辣根过氧化物酶(POD)连接的 OC 鼠源单克隆抗体	for 11 ml
(3) Standard 合成的 Glu-OC 冻干品 (8 ng)	for 1 ml
(4) Sample Diluent BlockAce- containing PBS (含防腐剂)	11 ml × 2
(5) Substrate Solution (TMBZ) 3,3',5,5'-Tetramethylbenzidine solution	12 ml

● 试剂盒外所需主要试剂及器材

- Wash and Stop Solution for ELISA without Sulfuric Acid (Code No. MK021)
洗液 (10 × PBS: 50 ml × 5 支、Tween 20: 3 ml) 和反应终止液 (60 ml)。
注意: 本制品不使用 Code No. MK021 中含有的 Tween 20。
* 本制品是不含 1 N H₂SO₄ 的过氧化物酶反应终止液。
* 反应终止液也可以使用 1 N H₂SO₄。使用 1 N H₂SO₄ 时要注意。
- 移液器、微量移液枪及枪头
- 酶标仪 (在 450 nm 处测定吸光值可达 3.5)

● 保 存: 4°C。

● 使用注意事项

1. 请使用同一批号的试剂盒和试剂, 不同批号的试剂盒组份和试剂不要混用。
2. 不要使用超过标签上保质期的试剂。
3. 为了避免试剂污染, 请使用一次性微量移液器枪头。
4. 叠氮化钠会使 POD 失活, 因此, 在此项检测中请不要使用包含叠氮化钠的溶液。
5. 在保存或保温过程中, Substrate Solution 要避免强光照射。
6. Substrate 和 Stop Solution 避免直接接触, 如果这些试剂接触到皮肤, 要用水充分冲洗。不要用口进行试剂吸取, 在检测样本或试剂组份操作区域, 不可以吸烟、吃喝等。所有的血液流体都被视为具有感染的可能性。
7. 避免 Substrate Solution 和 Stop Solution 接触金属。推荐使用一次性的玻璃试管进行 Substrate Solution 盛装。如果使用非一次性的玻璃试管, 使用完毕后, 要用酸清洗, 然后再充分用蒸馏水润洗干净。
8. 避免使用已变为深蓝色的 Substrate Solution。

● 使用方法

1. 检测样品

无菌条件下, 收集静脉血液样品, 在血液凝固和分层后, 立即去除血清或红细胞, 包含沉淀的样品在进行检测前必须是澄清的。不要使用溶血的血液样品。尿液样品收集首次排泄物, 样品可于 4°C 下保存 12 小时。如果样品收集和检测间超过 12 小时, 需冷冻保存, 但要避免反复冻融。检测前, 冻结样品应缓慢恢复至室温, 轻轻用手指弹匀。不要在热水浴中融解样品, 也不要剧烈振荡混匀。

2. 试剂的准备

注意: 下述试剂应于使用前制备。

- 酶标抗体工作液 (Antibody-POD Conjugate Solution)

在(2) Antibody-POD Conjugate 中加入 11 ml 蒸馏水使其溶解，轻轻混匀避免起泡。
溶解后 4℃保存 1 周性能稳定。1 周以上要-20℃保存。-20℃保存 1 个月性能稳定，且只能冻融一次。

• Standard Solution

在 Standard Solution 中加入 1 ml 蒸馏水后使其溶解，缓慢混匀。

Standard Solution 于-20℃保存 1 个月性能稳定，且只能冻融一次。

Standard Solution 浓度为 8 ng Glu-OC/ml。使用(4) Sample Diluent 梯度稀释 Standard Solution 至浓度依次为：4、2、1、0.5、0.25 和 0.125 ng/ml。

3. 操作方法

- 测定时进行 N=2 的平行反应。
- 试剂盒中的各试剂及检测样品使用前放置至室温，混合时避免产生气泡，混匀后再使用。
 - a. 用微量移液枪在抗体包被板的各孔中分别加入 100 μl 各浓度的 Standard Solution 和检测样品 (N=2)，室温 (20~30℃) 反应 2 小时。此时建议将样品预先准备于另一 96 孔板中，用 8 孔排枪快速地加入到抗体包被板中 (5 分钟内)。为获得高可信度的结果，应将梯度稀释的 Standard Solution 添加在 96 孔板的第 1 列和第 12 列中。37℃加热条件下抗原性可能降低。(第一反应)
 - b. 弃除反应液，用 Wash Buffer 清洗 3 次后，用 8 孔排枪在各孔中分别加入 100 μl 的酶标抗体工作液，室温 (20~30℃) 反应 1 小时。(第二反应)
 - c. 弃除反应液，用 Wash Buffer 清洗 4 次后，用 8 孔排枪在各孔中分别加入 100 μl 的(5) Substrate Solution (TMBZ)，室温 (20~30℃) 反应 10 ~15 分钟。(第三反应)
 - d. 按照 Substrate Solution (TMBZ) 添加的顺序在各孔中分别加入 100 μl 的 Stop Solution 终止反应后充分混合。
 - e. 蒸馏水作为对照调零，在 450 nm 处测定吸光度值。反应终止后 1 小时内显色稳定。
 - f. 在半对数坐标纸上作图，X 轴表示各 Standard Solution 的浓度，Y 轴表示吸光度值，绘制标准曲线后，根据检测样品的吸光度值可查出相应的 Glu-OC 浓度。

注意：

- 室温下反应或在恒温箱内反应时，为避免溶液蒸发，请用膜覆盖平板。
- 建议要完全去除 Washing Buffer。

*Wash Buffer:

将 Wash and Stop Solution for ELISA without Sulfuric Acid (Code No. MK021) 中的 10×PBS (50 ml) 加入到 450 ml 蒸馏水中来制备 Wash Buffer。

4. 结果

1) 标准曲线

- 记录每个标准品反应孔 450 nm 的吸光度值；
- 计算平行样的平均值并记录；
- X 轴表示各 Standard Solution 的浓度，Y 轴表示吸光度值，绘制标准曲线。

2) 样品

- 记录每个样品反应孔 450 nm 的吸光度值；
- 计算平行样的平均值并记录；
- 到标准曲线上找到 Y 轴的平均吸光度值，读取相应 X 轴的 Glu-OC 浓度。

● 特点

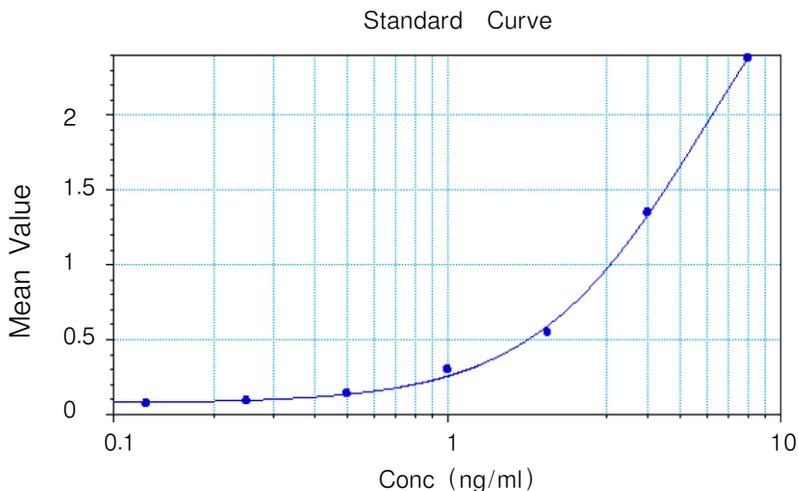
- 1、测定范围：0.25-8 ng/ml。
- 2、特异性：本制品检测 Glu-OC，与人骨 OC (可能是 Gla 型) 有 5.0% 交叉反应，与牛骨 OC (可能是 Gla 型) 有 1.7% 交叉反应。本制品可用于测定牛、兔、猪、山羊和绵羊 Glu-OC，但不能检测小鼠的 Glu-OC。除此之外，本制品没有定量检测过其他来源的 Glu-OC。

- 3、测定时间：测定操作 3 小时 30 分钟。
- 4、总测定容量：96 次。
- 5、测定样品量：如果所有检测孔（包括标准品和检测样品）进行 N=2 的平行反应，那么每个试剂盒可以检测 40 个样品。
- 6、检测样品：血清、血浆、尿液、细胞培养上清、细胞提取液。
- 7、样品体积量：如果每个检测样品进行 N=2 的平行反应，大约需要 220 μl （如：每个检测孔添加 100 μl ，吸取时可能有 10 μl 损失量）。必要时，需要稀释含约 2~3 倍高水平 Glu-OC 的血液样品。
- 8、限制因素：由于条件会因每次检测方法而有所变化，因此需要每次检测时，制作标准曲线。试剂间的交叉污染会使检测结果失败；使用一次性的移液枪头。
在保温反应间彻底清洗反应孔需要：
 - 1) 在分注新洗液前，每个孔中要完全去除剩余的液体；
 - 2) 每次清洗要使用足够的洗液（约 400 μl ）；
 - 3) 避免反应板在环境中裸露。
 只有样品的吸光度值落在标准曲线的范围内，才能获得准确的 Glu-OC 浓度。
- 9、注意事项：以对照血清检测结果为依据，可以测定生物样本中存在的抗原浓度。但是，对于特殊的疾病，也可能病人的血清样品中的未知因素而影响检测结果。相似的，正常健康的样品中也可能含有未知的污染。当未知的有机样本中的抗原水平比标准曲线的范围明显偏高时，建议将样本稀释后重新检测。

● 性 能

1. 标准曲线

下面是具有代表性的标准曲线例。为了获得准确的检测结果，每次测定时需绘制标准曲线。
最低检出灵敏度：0.25 ng/ml。



$$4\text{-P Fit : } y = (A - D)/(1 + (x/C)^B) + D$$

<u>A</u>	<u>B</u>	<u>C</u>	<u>D</u>	<u>R²</u>
0.0728	1.66	6.04	3.83	0.999

Std (Standards: Conc vs Mean Value)
Curve Fit Option - Fixed Weight Value

Glu-OC (ng/ml)	8.000	4.000	2.000	1.000	0.500	0.250	0.125	0.000
A ₄₅₀	2.381	1.349	0.546	0.298	0.140	0.091	0.071	0.058

片段化的骨钙素	1	17	21	24	43
			21	24	49
			21	24	43

以上是使用本制品检测到的结果，每个片段没有 Gla 残基。

5. 羟基磷灰石对血清中 Glu-OC 含量的影响。

羟基磷灰石 (HAP) 的处理能吸附有活性 (羧基化) 的 OC, 不能吸附脱羧基 OC。使用磷酸盐缓冲液洗脱并回收有活性的 OC。本制品能检测脱羧基 OC。

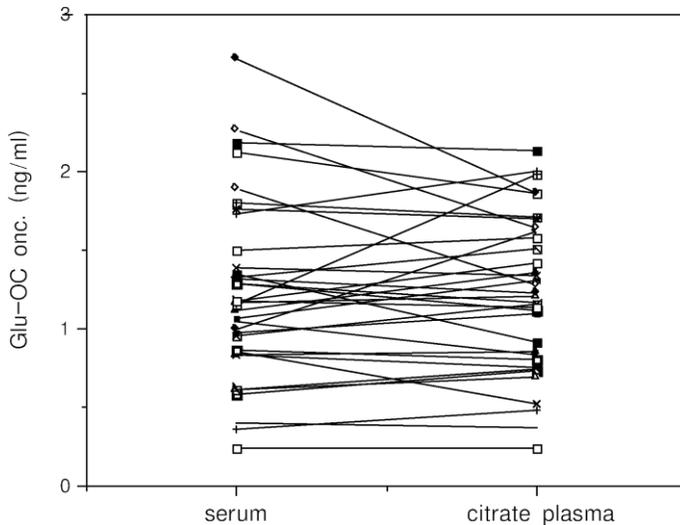
(ng/ml)

Sample No.	Serum Glu-OC	HAP treated serum Glu-OC	Glu-OC eluted with phosphate buffer
1	0.645	0.755	0.000
2	1.312	1.431	0.000
3	0.920	1.228	0.000
4	0.315	0.572	0.000
5	0.196	0.583	0.000
6	0.159	0.189	0.000
7	0.933	2.739	0.000
8	0.850	1.158	0.000
9	0.319	0.489	0.000
10	0.777	1.856	0.000
11	0.143	0.172	0.000

6. 在柠檬酸钠血浆和血清中的 Glu-OC 含量比较

在柠檬酸钠血浆和血清中的 Glu-OC 含量没有明显差别。通过统计学上足够数量的样品, 涉及到不同的年龄获得的数值。

Normal value of Glu-OC



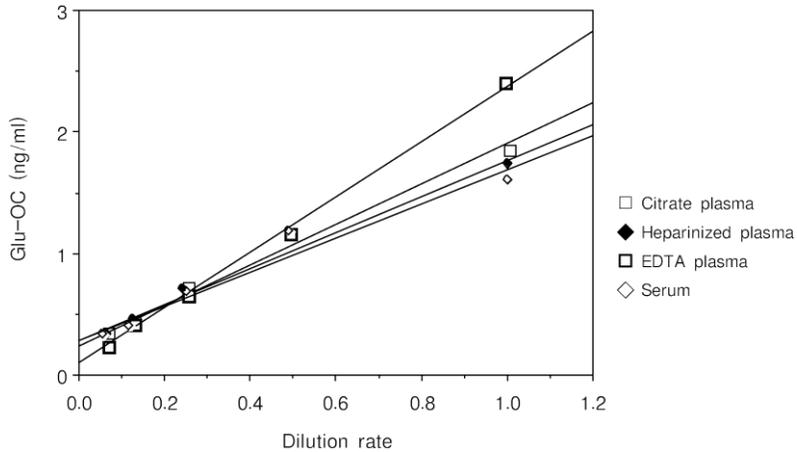
Average	1.236 ng/ml	1.210 ng/ml
S.D.	0.569	0.492

(n=35, 平均年龄为 29)

7、抗凝剂的影响

与不同抗凝剂处理的正常人样品的稀释标准曲线比较获得的几种抗凝剂的影响结果。

<样品稀释曲线及抗凝剂的影响>



$$y = 1.6687x + 0.23954 \quad r^2 = 0.992 \quad \text{Citrate plasma}$$

$$y = 1.4809x - 0.28583 \quad r^2 = 0.979 \quad \text{Heparinized plasma}$$

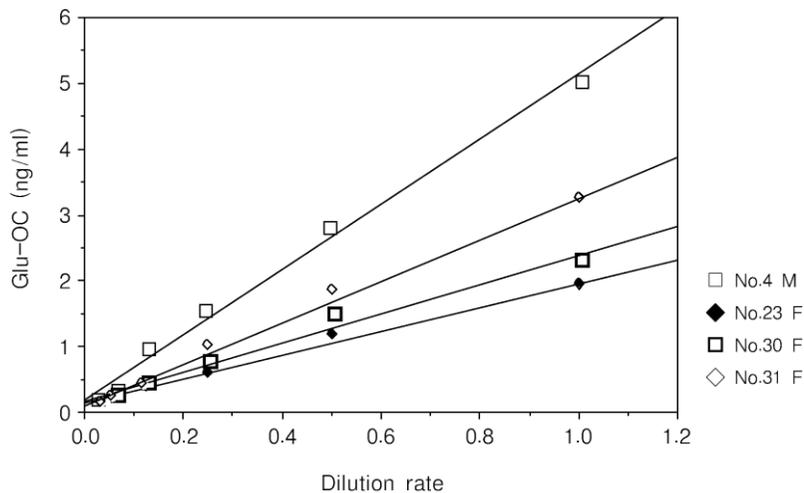
$$y = 2.2825x + 9.8195e-2 \quad r^2 = 0.995 \quad \text{EDTA plasma}$$

$$y = 1.4081x + 0.28226 \quad r^2 = 0.964 \quad \text{Serum}$$

8、不同血清样品的比较

四种不同的血清样品的稀释曲线比较结果如下：

<血清中 Glu-OC 稀释曲线比较>



$$y = 4.9676x + 0.18873 \quad r^2 = 0.996 \quad \text{No.4 M}$$

$$y = 1.8127x + 0.14717 \quad r^2 = 0.988 \quad \text{No.23 F}$$

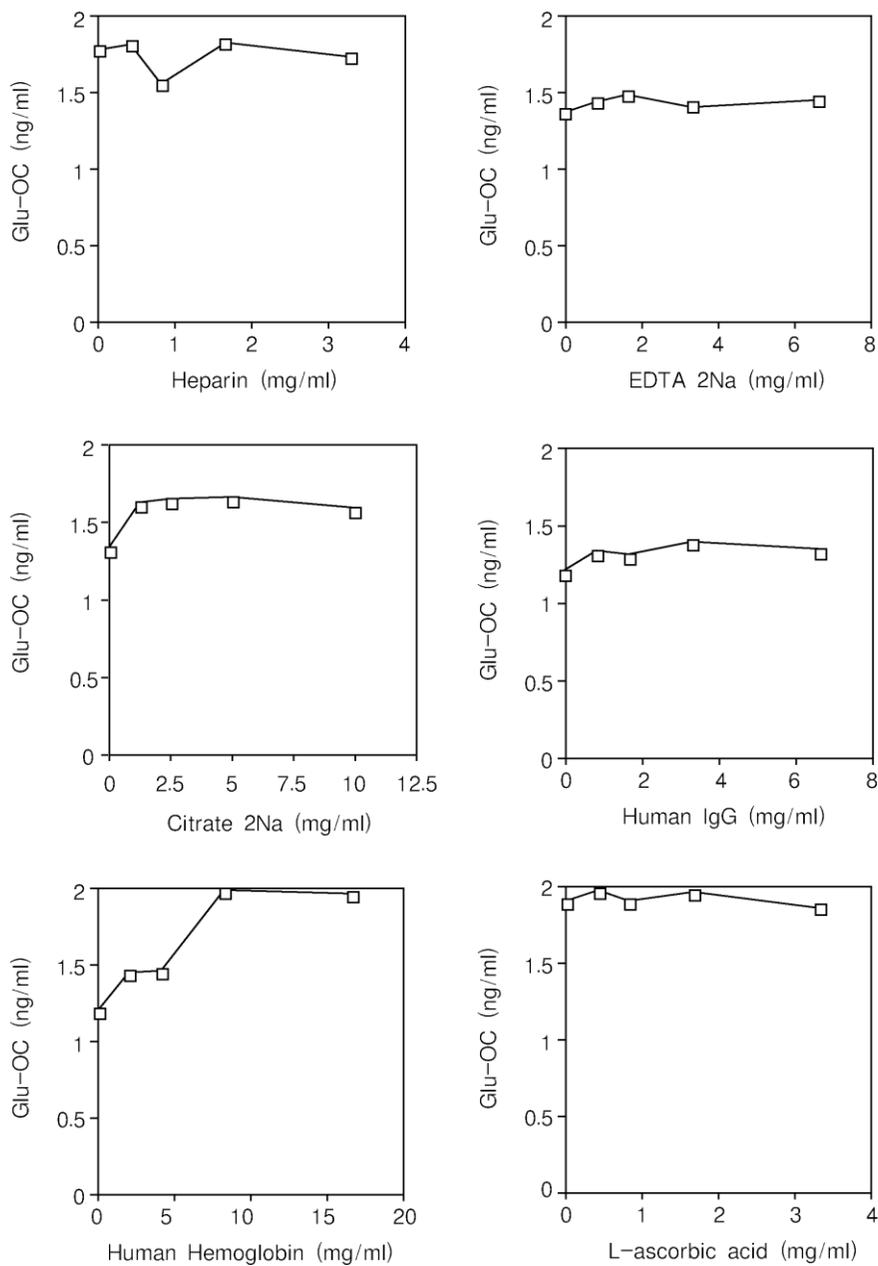
$$y = 2.2100x + 0.17442 \quad r^2 = 0.976 \quad \text{No.30 F}$$

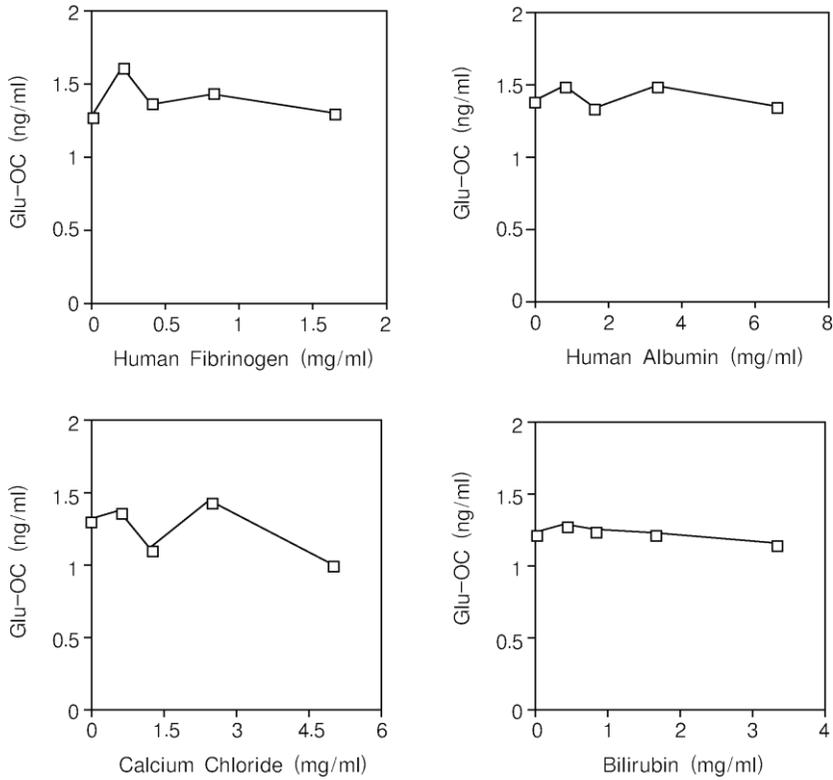
$$y = 3.1629x + 9.4473e - 2 \quad r^2 = 0.996 \quad \text{No.31 F}$$

Average	0.028	0.302	0.399
S.D.	0.053	0.007	0.413
n=	8	2	10

11. 共存物的影响

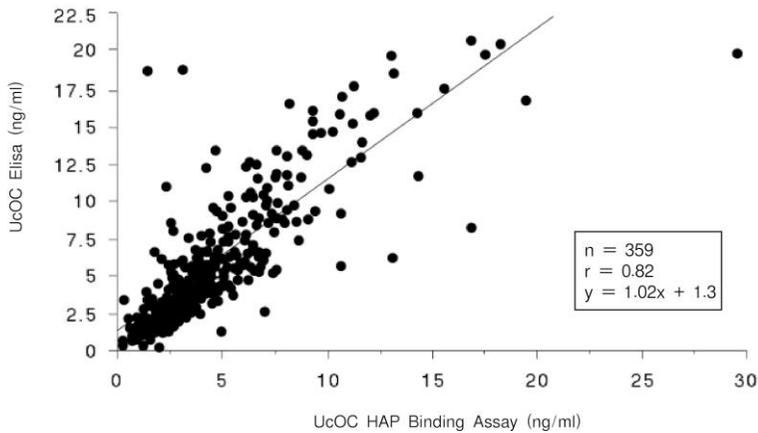
样品和共存物按照 4: 1 的体积比添加后对反应体系的影响。表中所示共存物浓度为终浓度。





12、与羟基磷灰石结合RIA方法的比较

来源于Undercarboxylated Osteocalcin (Glu-OC) EIA Kit的Glu-OC浓度数据与来自于羟基磷灰石结合RIA方法 (3, 4, 6) 数据的比较。



● 关联产品

- Gla-Type Osteocalcin (Gla-OC) EIA Kit (Code No. MK111)
- Mouse Glu-Osteocalcin High Sensitive EIA Kit (Code No. MK129)
- Human Gla-Osteocalcin High Sensitive EIA Kit (Code No. MK128)
- Rat Glu-Osteocalcin High Sensitive EIA Kit (Code No. MK146)
- Pig Glu-Osteocalcin EIA Kit (Code No. MK149)
- Wash and Stop Solution for ELISA without Sulfuric Acid (Code No. MK021)

● 参考文献

- 1) Poser J W, *et al* . *J Biol Chem* . (1980) **255**: 8685.
- 2) Plantalech L, *et al* . *J Bone Miner Res* . (1991) **6**: 1211.
- 3) Szulc P, *et al* . *J Clin Invest* . (1993) **91**: 1769.
- 4) Price P A, *et al* . *J Biol Chem* . (1980) **255**: 2938.
- 5) Koyama N, *et al* . *J Immunol Meth* . (1991) **139**: 17.
- 6) Vernaud P, *et al* . *J Clin Endocrinol Metab* . (1997) **82**: 719–724.

● 使用方法概述

- 1、准备所有指定试剂。
- 2、所有试剂放置至室温，制备溶液。
- 3、加入100 μ l Standard或样品到合适的反应孔中，室温（20~30°C）保温2小时。
- 4、去除反应液，用400 μ l PBS清洗反应孔3次。
- 5、加入100 μ l Antibody-POD Conjugate Solution到反应孔中，室温（20~30°C）保温1小时。
- 6、去除反应液，用400 μ l PBS清洗反应孔4次。
- 7、加入100 μ l Substrate Solution (TMBZ)到每个反应孔中，室温（20~30°C）保温10~15分钟。
- 8、加入100 μ l Stop Solution到每个反应孔中。混合均匀。
- 9、尽快读取450 nm的吸光度值。

注意

本产品仅供科学研究使用，不能用于人、动物的医疗或诊断程序，不能使用本产品作为食品、化妆品或家庭用品等。

未经Takara Bio Inc.书面许可授权或批准，不得制造、许诺销售、销售、进口Takara产品，或者使用Takara产品所有的相关专利及相关商标。

如果您需要其他用途的许可授权，请联络我们，或访问我们网站www.takara-bio.com。

您使用本产品必须遵守产品网页上适用的全部许可要求。阅读、了解并遵守此类声明的所有限制性条款是您的责任。

所有商标均属于各自商标所有者的财产。某些商标并未在全部行政区注册。

本文件由宝日医生物技术（北京）有限公司翻译制作，最新版本文件请参考 Takara Bio Inc.网站。为正确使用 Takara 产品，您应当掌握本产品的相关知识和使用说明。

技术咨询热线：

0411-87641685, 87641686
4006518761, 4006518769

TAKARA BIO INC.

URL: <http://www.takarabiomed.com.cn>

v201804Da