

1型胶原氨基端延长肽检测试剂盒(酶联免疫法)说明书

——BioTNT 品牌精选

【产品名称】

通用名称：1型胶原氨基端延长肽检测试剂盒（酶联免疫法）

英文名称：P1NP Test Kit（ELISA）

【包装规格】96人份/盒 货号：gf-001

【预期用途】本试剂盒适用于定量测定人血清或血浆中1型胶原氨基端延长肽。

【检验原理】本试剂盒采用双抗体夹心酶联免疫方法。利用生物素标记的小鼠抗P1NP单克隆抗体包被至链霉亲和素预包被微孔板的孔内。校准品、质控品和样本加入到微孔后，再加入辣根过氧化物酶标记的小鼠抗P1NP单克隆抗体，然后室温下孵育1小时，接着吸出孔内液体并洗涤。最后加入显色底物(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P1NP浓度成正比。

【主要组成成分】

1. 微孔板：孔内预包被链霉亲和素的微孔板，12×8孔。
2. 校准品A-F：可直接使用的含有P1NP的胎牛血清的磷酸盐缓冲液，6×0.4ml。
3. 质控品：可直接使用的含有P1NP的胎牛血清的磷酸盐缓冲液，2×0.4ml。
4. 生物素标记的抗体：含有生物素标记的P1NP抗体的蛋白稳定剂的磷酸盐缓冲液，1×0.2ml。
5. 酶结合物：含有辣根过氧化物酶标记的小鼠单抗、酶稳定剂和防腐剂的磷酸盐缓冲液，1×0.2ml。
6. 孵育缓冲液：含有蛋白稳定剂的磷酸盐缓冲液，1×30ml。
7. 洗液：含有吐温的50×Tris盐缓冲液，1×20ml。
8. 底物液（TMB）：可直接使用的四甲基联苯胺(TMB)底物(溶于酸性缓冲液中)，1×12ml。
9. 终止液：0.3M 稀硫酸，1×12ml。
10. 封板膜：4片
11. 说明书：1份
12. 质控报告单：1份

试剂盒应在有效期限之内使用，不要将不同批号的试剂混合。

【储存条件及有效期】

试剂盒于2~8℃保存，有效期为12个月；开封后于2~8℃保存，有效期为8周。

注：试剂盒须置于2~8℃保存，效期为12个月（自生产之日起计）。试剂盒可稳定至包装上所标示的最后日期。

未使用完的微孔板条应尽快放回至有干燥剂的铝箔袋中，封口后须放回2~8℃保存，并于8周内用完，如果离失效期不足8周，则以有效期为准。

稀释后的洗液在2-8℃下保存8周；如果离失效期不足8周，则以有效期为准。

其他组份在开封使用后须放回2~8℃保存，并于8周内用完，如果离失效期不足8周，则以有效期为准。

请勿使用失效的试剂。

【适用仪器】适用于具有450nm、650nm波长的酶标仪。

【样本要求】采用人血清或血浆（EDTA、肝素）。样本收集后应尽快分离，分离后的样本在22℃保存不超过8小时，2-8℃放置时不超过48小时，-20℃下放置时可保存2个月，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10μL，20μL和100μL的高精度移液器
- 2) 可移取100μL的高精度多道移液器
- 3) 微孔板振荡器
- 4) 自动洗板机（可选择）
- 5) 酶标仪和数据分析软件

2. 试剂准备：

- 1) 生物素溶液制备：将其按照1:100稀释于孵育缓冲液中（现用现配），室温下静置10分钟，混合均匀后使用。
- 2) 酶结合物溶液制备：将其按照1:100稀释于孵育缓冲液中（现用现配），室温下静置10分钟，混合均匀后使用。
- 3) 洗液：每瓶冲洗浓缩液按照1:50加入至蒸馏水或去离子水中混匀，室温下保存。

备注：所有其他试剂可直接使用，但在检测前应将其恢复至室温，反复颠倒使其混合均匀。

3. 操作步骤：

- 1) 加入100μl稀释过的生物素标记抗P1NP抗体于所需数量的微孔板微孔内，盖上封板膜，在微孔板振荡器(300转/分钟)上于20-25℃下孵育30分钟。
- 2) 用稀释好的洗液洗板5次。
 - a) 自动洗板：设置洗板机分配每孔至少250μl冲洗液。重复5次，于吸水纸上用力拍打倒置的板以去除残留的冲洗液。
 - b) 手工洗板：迅速颠倒倒出孔内物。每孔加入250μl冲洗液，迅速甩掉孔内洗液，于吸水纸上用力拍打倒置的板以去除残留的洗液。再重复此过程4次。
- 3) 加入50μl校准品、质控品和样本于相应的微孔板微孔内；然后再用移液器向所有微孔内加入50μl的孵育缓冲液（注：该操作应在15分钟内完成以减少误差）。
- 4) 盖上封板膜，在微孔板振荡器(300转/分钟)上于20-25℃下孵育60分钟。
- 5) 用稀释好的冲洗缓冲液洗板5次。
- 6) 加入100μl新鲜配制的酶结合物溶液
- 7) 盖上封板膜，在微孔板振荡器(300转/分钟)上于20-25℃下孵育60分钟。
- 8) 用稀释好的冲洗缓冲液洗板5次。
- 9) 用多道移液器于每孔内加入100μl TMB底物。
- 10) 盖上封板膜，在微孔板振荡器(300转/分钟)上于20-25℃下孵育15分钟。
- 11) 用多道移液器于每孔内加入100μl终止液。
- 12) 加入终止液后，30分钟内在酶标仪450nm（参考650nm）波

长处读取吸光度。

【参考区间】通过收集200例绝经前（后）的健康女性及60例健康男性的正常人群样本进行实验并分析。其中绝经前（后）女性参考了罗氏总I型胶原氨基端延长肽试剂盒参考区间建立起不同人群的参考区间（参考表 1）：表 1

人群		人数	参考范围 ((ng/ml)
女性	绝经前	100	15.13-58.59
	绝经后	100	16.27-73.87
男性	≤14岁	121	157.9-924.8
	15-29岁	121	133.2-198.0
	30-49岁	123	30.4-65.2
	50-69岁	120	18.6-54.9
	≥70岁	121	16.9-49.0

每个实验室应通过参考区间的适用性，必要时建立本实验室的参考区间。

【检验结果的解释】使用二次方程曲线拟合： $y = a + b*x + c*x^2$

以吸光度为纵坐标，P1NP浓度为横坐标，在坐标纸上绘出标准曲线。从标准曲线上计算未知样本的P1NP浓度值。

校准品吸光度参考值：表 2

校准品	浓度 (ng/ml)	吸光度 450-650nm	内推 P1NP 浓度 (ng/ml)
Standard A	780	2.49	
Standard B	312	1.022	
Standard C	124.8	0.388	
Standard D	49.92	0.16	
Standard E	19.968	0.069	
Standard F	0	0.012	
Ctrl 1		0.231	70.53
Ctrl 2		1.3995	433.69

【检验方法的局限性】对于P1NP水平高于最高浓度校准品的样本，应稀释后重新检测。同所有辅助诊断指标一样，应结合病人的临床表现和其它检测数据对P1NP的结果进行分析评估。

【产品性能】

1. 最小检测限：I型胶原氨基端延长肽≤5ng/ml
2. 重复性：变异系数（CV）≤10%。
3. 准确度：将已知浓度的待测物加入到低浓度待测物中，其回收率应在 90%-110%范围内。
4. 批间差：变异系数（CV）≤10%。

【注意事项】

1. 本产品仅用于体外诊断，不得用于其他用途。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），本公司概不负责。
2. 终止液含有0.3M硫酸，一旦触及眼睛，立即用大量水冲洗并咨询医生。必须穿戴保护性衣服和手套。
3. 显色底物包含3,3',5,5'-四甲基联苯胺，接触皮肤和吞食均有害。穿戴保护性衣服和手套。

【参考文献】

1. D.J.Leeming, D.V.Larsen, C.Zhang, Y.He, S.S.Veidal, R.H.Nielsen, K.Henriksen, Q.Zheng, V.Barkholt, B.J.Riis, I.Byrjalsen, P.Qvist, M.A.Karsdal. Enzyme - linked immunosorbent serum assays (ELISAs) for rat and human N - terminal pro - peptide of collagen type I (P1NP) - assessment of corresponding epitopes. Clin Chem, 2010, 43:1249 - 1256.
- 2.楼慧玲, 彭程, 陈巧聪.血清总骨1型胶原前胶原氨基端延长肽、胶原羧基端肽β特殊序列、维生素D测定在老年骨质疏松症患者髌部脆性骨折中的临床价值[J].南方医科大学学报, 2012, 32(9): 1346-1349.
3. Patrick Garner, Elisabeth Sornay-Rendu, FrançoisDuboeuf, et al. Markers of bone turnover predict postmenopausal forearm bone Loss over 4 years: The OFELY Study. J Bone Miner Res 1999,14:1614-1621.
4. Garner P, Sornay-Rendu E, Clausrat B, et al. Biochemical markers of bone turnover, endogenous hormones and the risk of fractures in postmenopausal women: The OFELY study. J Bone Miner Res 2000,15:1526-1536.
- 5.Ahmad AM, Hopkins MT, Fraser WD, et al. Parathyroid hormone secretory pattern, circulating activity, and effect upon bone deficiency. Bone 2003,32(2):170-179.
- 6.Blumsohn A, Naylor KE, Timm W, et al. Absence of marketed seasonal change in bone turnover. A longitudinal and multicentre cross-sectional study. J Bone Miner Res 2003,18(7):1274-1281.
- 7.Clowes JA, Hannon RA, Yap TS, Hoyle NR, et al. Effect of feeding on bone turnover markers and its impact on biological variability of measurements. Bone 2002,30(6):886-890.
- 8.Clowers JA, Robinson RT, Heller SR, et al. Acute changes of bone turnover and PTH induced by insulin and glucose: Euglycemic and hypoglycaemic hyperinsulinemic clamp studies. J Clin Endocrinol Metab 2002,87:3324-3329.
9. 刘刚, 卢光琇.β-Crosslaps和P1NP在绝经后妇女骨质疏松诊断中的效能评价[J].国际检验医学杂志, 2010, 31(8).