

尿中 II 型胶原 C 端肽酶联免疫吸附分析试剂盒使用说明书

【产品名称】

通用名称：尿中 II 型胶原 C 端肽酶联免疫吸附分析试剂盒

英文名称：(Urine CartiLaps® ELISA)

【包装规格】

96 人份/盒

【预期用途】

尿中 II 型胶原 C 端肽酶联免疫吸附分析试剂盒(Urine CartiLaps® ELISA)检测人尿中 II 型胶原 C 端肽(CTX-II)降解产物。该检测只用于研究，不用于诊断。

IDS公司对将试剂用于除上面指定用途以外的任何其他用途的后果不予负责，对未按照本手册所示方法而错误使用本试剂不予负责；此外，对由使用者或第三方根据尿中II型胶原C端肽酶联免疫吸附分析试剂盒的结果所做诊断或结论，以及其解释所导致的任何后果不予负责。

【背景介绍】

软骨结构完整性的损伤是骨关节炎和类风湿关节炎的主要组织学表现。II型胶原蛋白是软骨的主要有机成分。软骨降解后，II型胶原蛋白的片段(CTX-II)释放进入循环系统，随后排入尿中。尿中的CTX-II片段可由尿中II型胶原C端肽酶联免疫吸附分析试剂盒定量检测。

据报道，尿中 II 型胶原 C 端肽酶联免疫吸附分析有利于预测骨关节炎的发展(Reijman 2003, Garnero 2003) 及其它临床和临床前研究(见参考文献)。

【检验原理】

尿中 II 型胶原 C 端肽酶联免疫吸附分析试剂盒 (Christgau 2001)是基于一种单克隆抗体对尿 II 型胶原片段，或对结合于链霉抗生物素蛋白包被的微孔板表面的生物素标记合成肽的竞争性结合。首先，生物素标记的合成肽结合于包被有链霉抗生物素蛋白的微孔板表面。清洗之后，加入标准品、质控和尿样，然后加入单克隆抗体溶液。再次清洗，并加入过氧化物酶偶联的兔抗鼠免疫球蛋白。再次清洗后，加入生色底物，用硫酸终止显色反应并测定吸光度。

【主要组成成份】

1. 链霉抗生物素蛋白(Streptavidin) 包被的微孔板 (MTP)

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. 尿CartiLaps®标准A(瓶A)

一瓶(至少3.0mL)可直接使用的含有蛋白质稳定剂、去污剂和防腐剂的TRIS缓冲溶液。

3. 尿CartiLaps®标准B—F(瓶B—瓶F)

五瓶(至少0.5mL/瓶)可直接使用的合成肽(溶于含蛋白质稳定剂、去污剂和防腐剂的TRIS缓冲溶液中)。合成肽的准确浓度标在各瓶上。

4. 尿CartiLaps®质控(瓶CO)

一瓶(至少0.5mL)可直接使用的合成肽(溶于含有蛋白质稳定剂、去污剂和防腐剂的TRIS缓冲溶液中)。

5. 生物素标记的尿CartiLaps®抗原(1号瓶)

一瓶(至少12.0mL)可直接使用的生物素标记合成肽(溶于含蛋白质稳定剂、去污剂和防腐剂的PBS缓冲溶液中)。

6. 一抗(2号瓶)

一瓶(至少12.0mL)可直接使用的单克隆抗体(溶于含蛋白质稳定剂、去污剂、防腐剂和红色染料的TRIS缓冲溶液中)。

7. 过氧化物酶偶联抗体(3号瓶)

一瓶(至少12.0mL)可直接使用的过氧化物酶偶联的兔抗鼠免疫球蛋白(溶于含蛋白质稳定剂、去污

剂、防腐剂和蓝色染料的TRIS缓冲溶液中)。

8. 底物溶液 (瓶TMB)

一瓶(至少12.0mL)可直接使用的四甲基联苯胺(TMB)底物(溶于酸性溶液中)。请注意该生色底物可带浅蓝色。

9. 终止液 (瓶ST)

一瓶(至少12.0mL)可直接使用的0.18M硫酸溶液。

10. 清洗溶液 (瓶W)

一瓶(至少20.0mL)含有去污剂和防腐剂的浓缩清洗缓冲液。

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】

收到尿中 II 型胶原 C 端肽酶联免疫吸附分析试剂盒试剂后将其存放在 2—8°C 的条件下。试剂盒在此条件下稳定至包装盒上所标有效日期。

【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】

建议取第二次晨尿样本，也可使用任何时间点的尿样。尿样在4°C下24小时内稳定，长期储存应冷冻存放(<-18°C)。尿样至少在10次冻融周期内保持稳定。使用前尿样应震荡并沉淀至少30分钟。

【检验方法】

所需的仪器及试剂(未提供)

- 制备清洗溶液的容器。
- 准确移取40μL的微量移液器
- 准确移取100μL的8通道或12通道微量移液器
- 蒸馏水
- 冰箱(2—8°C)
- 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(18-22°C)。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。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. 预孵育

向各孔加入100μL生物素标记的尿CartiLaps®抗原(1号瓶)加入各微孔板，用封口膜密封，室温(18—22°C)孵育30±5分钟，不要震荡。

2. 清洗

清洗缓冲溶液(瓶W)以1体积浓缩缓冲溶液+50体积蒸馏水的比例稀释。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中的溶液倒干净。

3. 一抗孵育

向适当的孔中加入移取40μL尿CartiLaps®标准品(瓶A—瓶F)，质控(瓶CO)或待测尿样，再加入100μL一抗(2号瓶)。用封口膜密封微孔板，在冰箱中(2—8°C)孵育21±3小时，不要震荡。

4. 清洗

见第2步。

5. 二抗孵育

向各孔加入100μL过氧化物酶偶联抗体溶液(3号瓶)。用封口膜密封微孔板，在室温(18—22°C)孵育60±5分钟，不要震荡。

6. 清洗

见第2步。

7. 与生色底物溶液孵育

向各孔加入100 μ L底物溶液(瓶TMB)，用封口膜密封，室温（18—22 $^{\circ}$ C），避光孵育15 \pm 2分钟，不要震荡。

8. 终止显色反应

向各孔加入100 μ L终止溶液(瓶ST)。

9. 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低于标准F，建议用标准A稀释样本。

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CTX-II正常值和病理值范围。各类人群的平均值和标准偏差举例如下。详细内容请参阅本说明末尾的参考文献。

人群	人数	年龄 (岁)	平均CTX-II值(ng/mmol)	SD(ng/mmol)
所有妇女	459	20-85	299	79-1137
20-30岁绝经前妇女	38	20-30	464	103-2086
30-60岁绝经前妇女	165	30-59	200	65-618
绝经后妇女	256	46-85	363	112-1172
48-53 岁绝经前妇女	28	50.0 \pm 1.3	164	66-410
48-53 岁绝经后妇女	38	51.4 \pm 1.3	318	89-1132
所有男性	247	22-87	278	87-895
20-30岁男性	27	20-30	501	214-1171
30-60岁男性	141	30-60	236	89-628
>60岁男性	79	60-87	305	85-1096

【检验结果的解释】

结果处理

用四参数对数曲线拟合构建标准曲线，用内推法确定质控（CO）和患者样本中尿CartiLaps[®]的浓度。

结果举例

样本	尿CartiLaps [®] 浓度 (ng/ml)	Abs _{450-650nm} 吸光度1/ 吸光度2 (Abs.)	吸光度平均值 (Abs.)	内推尿CartiLaps [®] 浓 度 (ng/ml)
标准A	0.00	2.018 / 1.995	2.007	
标准B	0.64	1.391 / 1.404	1.398	
标准C	1.18	1.152 / 1.263	1.208	
标准D	2.51	0.708 / 0.663	0.686	
标准E	4.88	0.387 / 0.382	0.385	
标准F	9.48	0.202 / 0.202	0.202	
质控(CO)	1.50	1.038 / 0.960	0.999	1.37
样本1		0.290 / 0.272	0.281	6.90
样本2		1.303 / 1.257	1.280	0.81
样本3		0.475 / 0.531	0.503	3.68

请注意：以上数据仅为举例，不可用于计算其它实验的结果。

用肌酐浓度校正

上述所得CTX-II值要用尿肌酐浓度校正。

用临床化学分析仪酶比色法（如Roche/Hitachi分析仪的CREA法）确定样本中尿肌酐的浓度（mmol/L），并用如下公式进行校正：

$$\text{CTX-II 校正值}(\text{ng}/\text{mmol}) = 1000 \times \text{尿CartiLaps}^{\text{®}}(\text{ng}/\text{ml}) / \text{尿肌酐}(\text{mmol}/\text{L})$$

【产品性能指标】

批次间差异： <7%

批次间差异由三个批次尿中II型胶原C端肽酶联免疫吸附分析试剂盒测试三个尿样确定。

	平均值(ng/ml)	SD(ng/ml)	CV%
低	0.47	0.023	7.0
中	1.87	0.064	3.4
高	5.44	0.136	2.5

检测极限： 0.20ng/ml

检测极限为0.20ng/ml，此值为低于尿CartiLaps[®]标准A(瓶A)21个吸光度测定平均值三个标准偏差所对应的浓度。

精确度 ≤12.2%

精确度由对尿样进行十轮，每轮一式二份的分析结果确定。

样本	平均值 (ng/ml)	批内≤7.8%		批间≤12.2%	
		SD(ng/ml)	CV%	SD(ng/ml)	CV%
低	0.52	0.04	7.8	0.06	12.2
中	1.84	0.08	4.6	0.20	10.8
高	5.50	0.28	5.2	0.38	6.9

稀释/线性 96%

尿中II型胶原C端肽酶联免疫吸附分析试剂盒的稀释回收率为96%。4个样本用尿CartiLaps[®]标准A适当稀释。CTX-II浓度用尿中II型胶原C端肽酶联免疫吸附分析试剂盒测定，回收率用稀释因子校正。

	样本1	样本2	样本3	样本4	总回收率
DF	RC%	RC%	RC%	RC%	
1x	100	100	100	100	96%
2x	92	104	92	98	
4x	88	105	86	93	
8x	84	104	89	108	

DF: 稀释因子; RC: 回收率

干扰

加入以下化合物至人尿样，未检测到对尿中II型胶原C端肽酶联免疫吸附分析产生干扰。

尿素	最高	30	g/L
肌酐	最高	10	mg/L
葡萄糖	最高	5	mg/L
抗坏血酸	最高	5	mg/L
白蛋白	最高	50	mg/L
布洛芬	最高	50	g/L
乙酰水杨酸	最高	50	g/L
扑热息痛	最高	50	g/L

特异性

尿中II型胶原C端肽酶联免疫吸附分析试剂盒所测抗原决定簇高度保守，因此测试可用于大部分其它物种的尿样，包括非人灵长类、牛、马、猪、兔子、大鼠和小鼠。

【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. Ceunick F De, Sabatini M, Renoux V, Nanteuil G de, Pastoureau P. Urinary collagen type II C-telopeptide fragments are sensitive markers of matrix metallo-proteinase dependent cartilage degradation in rat adjuvant induced arthritis. *J Rheumatol* (2003); 30: 1561-1564.
2. Christgau S, Tankó LB, Cloos PAC, Mouritzen U, Christiansen C, Delaissé J-M, Høegh-Andersen P. Suppression of Elevated Cartilage Turnover in Postmenopausal Women and in Ovariectomized Rats by Estrogen and a Selective Estrogen Receptor Modulator (SERM). Submitted.
3. Christgau S, Henrotin Y, Henriksen DB, Rovati LC, Collette J, Bruyere O, Deroisy R, Christiansen C, Reginster JY. Cartilage Degradation In Glucosamine Sulphate Treated Knee Osteoarthritis Patients With Elevated Levels Of Urinary Collagen Type II Ctelopeptide Fragments. *Clin Exp Rheumatol*. 2004 Jan-Feb;22(1):36-42
4. Christgau S, Garnero P, Fledelius C, Moniz C, Rosenquist C, Ensig M, Gineyts E, Christiansen C, Qvist P. Collagen type II degradation products in urine as an index of cartilage degradation. *Bone* (2001); 29: 209-215.
5. Forsblad d'Elia H, Christgau S, Mattsson L-Å, Saxne T, Ohlsson C, Nordborg E, Carlsten H. Hormone replacement therapy decreases markers of cartilage and bone metabolism in rheumatoid arthritis. Submitted.
6. Garnero P, Mazières B, Gueguen A, Abbal M, Berdah L, Freiburghaus C, Lequesne M, Nguyen M, Salles J-P, Vignon E, Dougados M. Association of 10 molecular markers of bone, cartilage and synovium with disease activity and joint damage in hip osteoarthritis patients: the ECHODIAH cohort. *ACR* 2003.
7. Garnero P, Landewé R, Boers M, Verhoeven A, Linden S van der, Christgau S, Heijde D van der, Boonen A, Geusens P. Association of baseline levels of markers of bone and cartilage degradation with long-term progression of joint damage in patients with early rheumatoid arthritis: the COBRA Study. *Arthritis & Rheum* (2002); 46:2847-2856.
8. Garnero P, Ayrat X, Rousseau J-C, Christgau S, Sandell L, Delmas PD, Dougados M. Uncoupling of type II collagen synthesis and degradation predicts progression of joint damage in patients with knee osteoarthritis. *Arthritis & Rheum* (2002); 46:2613-2624.
9. Garnero P, Gineyts E, Christgau S, Finck B, Delmas PD. Association of baseline levels of urinary glucosyl-galactosyl pyridinoline and type II collagen C-telopeptide with progression of joint destruction in patients with early rheumatoid arthritis. *Arthritis & Rheum* (2002); 46: 21-30.
10. Garnero P, Christgau S, Delmas PD. The bisphosphonate Zoledronate decreases type II collagen breakdown in patients with Paget's disease of bone. *Bone* (2001); 28: 461-464.
11. Garnero P, Piperno M, Gineyts E, Christgau S, Delmas PD, Vignon E. Cross sectional evaluation of biochemical markers of bone, cartilage, and synovial tissue metabolism in patients with knee osteoarthritis: relations with disease activity and joint damage. *Ann Rheum Dis*. (2001); 60: 619-26.
12. Høegh-Andersen P, Tankó LB, Andersen T, Vingsbo C, Heegaard A-M, Delaissé J-M, Christgau S. Ovariectomized Rats as a Model of Postmenopausal Osteoarthritis. Validation and Application. *Annals of Rheum Dis*. (2004); 6(2): R169-80
13. Jensen T, Hansen M, Stoltenberg M, Christgau S, Florescu A, Sommarin Y, Lorenzen I.

- Biochemical markers of connective tissue metabolism in patients with rheumatoid arthritis. Relationship to disease activity, radiographic outcome and bone mineral density. Submitted.
14. Jung M, Christgau S, Lukoschek M, Henriksen DB, Richter W. Elevated urinary concentration of collagen type II C-telopeptide fragments in patients with osteoarthritis. *Pathobiology*. (2004); 71(2): 70-6
 15. Lehmann HJ, Mouritzen U, Christgau S, Cloos PAC, Christiansen C. The effects of bisphosphonates on CartiLaps: A new marker for cartilage degradation. *Annals of Rheumatic Diseases* (2002); 61:530-533.
 16. Mazières B, Garnero P, Gueguen A, Abbal M, Berdah L, Freiburghaus C, Lequesne M, Nguyen M, Salles J-P, Vignon E, Dougados M. Molecular markers of cartilage breakdown and synovitis are strong independent predictors of structural progression of hip osteoarthritis (OA). the ECHODIAH cohort. *ACR* 2003.
 17. Mouritzen U, Christgau S, Lehmann HJ, Tankó LB, Christiansen C. CartiLaps: A novel marker of Cartilage Degradation. The influence of age, gender, menopause, hormone replacement therapy and bone mass index. *Annals Rheum Dis*. (2003); 62: 332-336.
 18. Roy-Beaudry M, Martel-Pelletier J, Pelletier J-P, M'Barek KN, Christgau S, Shipkolye F, Moldovan F. Entothelin-1 promotes osteoarthritic cartilage degradation via mmp-1 and mmp-13 induction. *Arthritis & Rheum* (2003); 48:2855-2864.

【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：+86 10 58895646 +86 20 32293178

传真：+86 10 58895611 +86 20 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3401262号

【产品标准编号】

YZB/ DAM 0213-2006

【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！