

硬骨素试剂盒（酶联免疫法）

1 介绍

标准的 Wnt 信号在通过提高成骨细胞调节骨的稳定状态起着重要作用。Wnt 通路的负调节因子对增强骨重吸收的疾病治疗是重要的新的治疗目标。其中一种就是硬骨素，分子量是 22.5 kD 的分泌糖蛋白，通过与 Wnt-共受体 LRP5 的结合而防止与 Wnt 分子的结合。硬骨素几乎都是在骨细胞中产生的。因此认为是提供骨特异性最高的临床标记物。

应用范围：

骨质疏松症

肿瘤诱导的骨疾病

风湿性关节炎

慢性炎症

肾病

合成代谢治疗监测

2 试剂盒组分

目录	试剂盒组分	数量
微孔板	多克隆羊抗人硬骨素抗体，预包装在微孔板条孔内，装在附有干燥剂的铝袋	12 × 8 条
冲洗缓冲液	冲洗缓冲液，自然色，20 倍浓缩	1 × 50ml
ASYBUF	实验缓冲液，红盖，直接使用	1 × 20ml
AB	单克隆鼠抗人硬骨素抗体-生物素标记，绿盖，直接使用	1 × 7ml
STD	标准品 1-6 (0;15;30;60;120;240pmol/l)，白盖，冻干品	6 瓶冻干品
CTRL	质控品，黄盖，冻干品（标签上有准确浓度）	1 瓶冻干品
CONJ	结合物（链霉亲和素-HRPO），琥珀色瓶，琥珀色盖，直接使用	1 × 22ml
SUB	底物溶液(TMB 溶液)，琥珀色瓶，蓝盖，直接使用	1 × 22ml
STOP	终止液，白盖，直接使用	1 × 7ml

3 试剂盒附带的材料

3.1 2 个封板膜

3.2 质控报告单

3.3 使用说明书

4 自备材料

4.1 高精度加样器(可移取 20µl, 50µl, 150µl, 200µl, 400µl) 和一次性枪头

4.2 蒸馏水或去离子水

4.3 洗板机，多道加样器或多功能分液器

4.4 酶标仪有 450nm(修正波长 630nm)

4.5 计算结果的软件

5 试剂和样本准备

5.1 所有试剂在 4°C (2-8°C) 下保存可稳定至有效期。

5.2 用标准的血清或血浆收集管收集静脉血样本。建议尽快离心分离血清或血浆（如：2000 × g 分离 20 分钟，最好在 4°C (2-8°C) 下）。离心前如果温度不能保存在 4°C (2-8°C) 的（在一天内），所需的血清或血浆样本应该尽快检测。样本更长时间储存需 -20°C，长期储存需 -70°C。所有样本只能反复冻融 4 次。脂质和溶血样本可能会出现错误结果。样本实验前要充分摇匀。建议复孔检测。

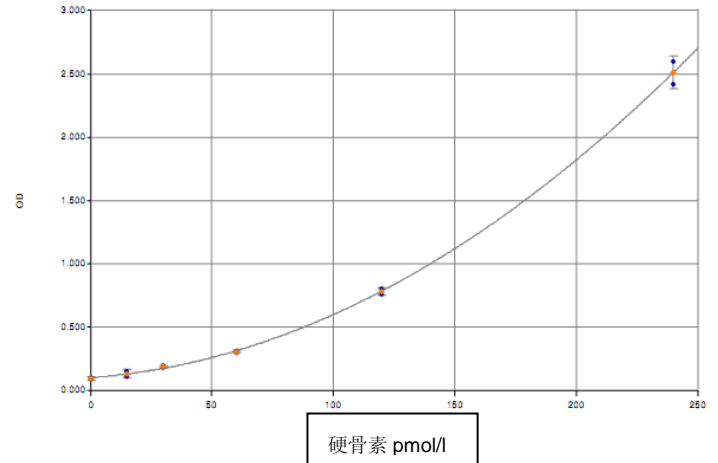
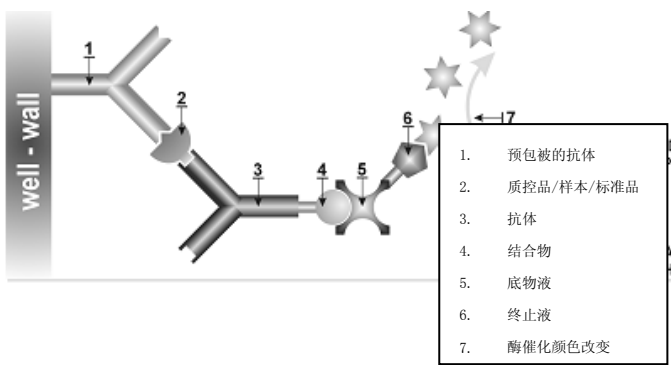
5.3 用实验稀释液稀释样本或减少样本量（线性结果超出 4 倍范围）。硬骨素浓度超出 240pmol/l 时是不一定要稀释样本的，样本量可以用 10 µl。

5.4 样本稳定性的更多信息请登录网站 www.bmgrp.com/products/assaycharacteristics/sample_stability 或者联系客服电话 400-889-1566

5.5 冲洗缓冲液 (WASHBUF)：1:20 稀释：如用 50ml 的浓缩冲洗液+950ml 的蒸馏水稀释。浓缩冲洗液的结晶会在室温溶解。稀释的缓冲液在 2-8°C 下保存可稳定至有效期。实验过程中仅能用稀释的缓冲液。

5.6 标准品 (STD) 和质控品 (CTRL)：用 400µl 去离子水或蒸馏水复溶，室温放置 15 分钟。期间摇匀使其充分溶解。复溶的标准品和质控品在 -20°C 下保存可稳定至有效期。避免反复冻融。

6. 基本原理



7 实验步骤

所有试剂和样本在实验前要平衡到室温（18-26℃）。计划草案上做好空白/标准品/样本/质控品（BLANK/STD/SAMPLE/CTRL）标记。从铝袋中拿出微孔板条，空白孔最少做一个孔。未使用完的微孔板条放回有干燥剂的铝袋中在 4℃（2-8℃）下保存，板条可稳定保存到有效期。

- 7.1 每孔加入 150μl 实验缓冲液 ASYBUF（红盖）。
- 7.2 于相应的微孔内加入 20μl 标准品/样本/质控品 STD/SAMPLE/CTRL，复孔检测，空白孔不加。
- 7.3 每孔加入 50 μl 的 AB(生物素标记抗硬骨素抗体，绿盖)，缓和的混匀，空白孔不加。
- 7.4 用盖板盖紧，避光室温（18-24℃）孵育 18-24 小时。**注意：孵育温度高于室温会降低最高 OD 值。**
- 7.5 用冲洗缓冲液（WASHBUF）每孔 300μl 洗板 5 次。最后一次洗板后，于吸水纸上用力拍打倒置的板以去除多余的冲洗液。
- 7.6 每孔加入 200μl 的 CONJ（结合物，琥珀色/黄色盖）。
- 7.7 用盖板盖紧，避光室温（18-24℃）孵育 1 小时。
- 7.8 用冲洗缓冲液（WASHBUF）每孔 300μl 洗板 5 次。最后一次洗板后，于吸水纸上用力拍打倒置的板以去除多余的冲洗液。
- 7.9 每孔加入 200μl 的 SUB（底物，蓝盖）。
- 7.10 避光室温（18-24℃）孵育 30 分钟。
- 7.11 每孔加入 50μl 的 STOP（终止液，白盖）。
- 7.12 立即在 450nm（参考 630nm）波长处读取吸光率。

8 计算结果

8.1 所有孔扣除本底空白孔 OD 值。用标准品的 OD 值建立标准曲线，用商用有效的软件计算。从标准曲线获得样本浓度。实验用 4PL 曲线评定。操作者需用不同的拟合曲线方法评定。如果样本量是 10μl，其浓度应该乘以 2。

典型标准曲线：

8.2 控报告单上提供有每个试剂盒生产日期的最后放行质控结果。每个客户获得的 OD 值会因不同的影响或由于在有效期内信号强度的正常降低而不同。然而，这不会影响到有效结果，只要最高浓度的标准品获得的 OD 值为 1.00 或更高，质控品在质控范围（目标范围见表）

9 实验描述

明显健康人群的值 (pmol/l):	中值=26.1 pmol/l (n=40) 95% perzentile...47.9 pmol/l 5% perzentile...11.9 pmol/l 建议每个实验室建立正常的范围
标准品范围:	0-240 pmol/l
转换因数 pg/ml 转换到 pmol/l:	1 pg/ml =0.044 pmol/l (MW:22.5kD)
交叉反应:	
样本用量:	20μl 人 EDTA 血浆，血浆肝素，血清，细胞培养上清
检测限:	(0pmol/l+3SD): 8.9 pmol/l
孵育时间:	18-24 小时/1 小时/30 分钟

更多的实验描述信息请登录网址 www.bmgrp.com/products/assaycharacteristics 或系客服电话 400-889-1566

10 精密度

- 10.1 批内精密度：2 个已知浓度的样本重复检测 16 次，通过批内精密度检测
- 10.2 批间精密度：2 个已知浓度的样本进行 3 批实验检测，通过批间精密度检测

批内实验 (n=16)	样本 1	样本 2	批间实验 (n=3)	样本 1	样本 2
-------------	------	------	------------	------	------

均值 (pmol/l)	100	183
CV%	4%	6%

均值 (pmol/l)	85	174
CV%	7%	5%

11 技术提示

- 11.1 不能用其他批号或来源的试剂混合或者代替使用。
- 11.2 不能和不同的试剂或不同批号的试剂塞子和盖子混合使用。
- 11.3 不能使用过期试剂。
- 11.4 避免暴露在阳光下。
- 11.5 底物溶液直到加入板孔前应保持无色。
- 11.6 为确保精确的结果，孵育过程中板薄膜的适当粘合是必需的。
- 11.7 混合试剂时避免产生气泡。

12 注意事项

- 12.1 所有人源性试剂组分由第三方检测是 HIV 抗体，HBsAg 阴性结果。但是也要当做是可 12.2 传染性物质处理和丢弃。
- 12.3 所有液体试剂包含 0.01% 的 Proclin300 作为防腐剂。避免皮肤和黏膜的接触。
- 12.4 Proclin300 在本试剂盒中的使用浓度不至于有毒。会产生皮肤过敏反应——避免接触皮肤和眼睛。
- 12.5 不要用嘴吸。
- 12.6 所用试剂不能吃，喝，吸取或者用于化妆美容方面。
- 12.7 避免接触试剂，应穿戴适当的手套。
- 12.8 硫酸对眼和皮肤有刺激。避免皮肤和黏膜的接触。如果不慎受到刺激——用大量的水清洗。

13. 参考文献

- 1) Gaudio A et al.: Increased Sclerostin Serum Levels Associated with Bone Formation and Resorption Markers in Patients with Immobilization-Induced Bone Loss. *J Clin Endocrinol Metab*, (May 2010); 95: 2248 – 2253.
- 2) Mirza F et al.: Serum Sclerostin Levels Negatively Correlate with Parathyroid Hormone Levels and Free Estrogen Index in Postmenopausal Women. *J Clin Endocrinol Metab* (2010), Apr 2010; 95: 1991 – 1997
- 3) Kneissel M: The Promise of Sclerostin Inhibition

for the Treatment of Osteoporosis. *IBMS BoneKey* (2009), 6: 259- 264.

- 4) Terpos E et al.: High Serum Sclerostin Correlates with Advanced Stage, Increased Bone Resorption, Reduced Osteoblast Function, and Poor Survival in Newly-Diagnosed Patients with Multiple Myeloma. *Blood* (2009), 114: 425.
- 5) Yuen H et al.: The Prognostic Significance of BMP-6 Signalling in Prostate Cancer. *Mod Path* (2008), 21(12):1436-1443.
- 6) Appel H et al.: Altered Skeletal Expression of Sclerostin and its Link to Radiographic Progression in Ankylosing Spondylitis. *Arthritis Rheum* (2009), 60(11): 3257-3262.
- 7) Wehmeyer C et al.: The Role of the WNT inhibitor sclerostin in rheumatoid arthritis. *Ann Rheum Dis*, (Mar 2010); 69: A21 doi:10.1136/ard.2010.129593n.
- 8) Choi Y et al.: Promising Bone-Related Therapeutic Targets for Rheumatoid Arthritis. *Nat Rev Rheumatol* (2009), 5(10): 543-548.
- 9) Eddleston et al.: A Short Treatment with an Antibody to Sclerostin can Inhibit Bone Loss in an Ongoing Model of Colitis. *J Bone Miner Res* (2009), 24(10): 1662-1671.
- 10) M Lee and NC Partridge: Parathyroid Hormone Signalling in Bone and Kidney. *Curr Opin Nephrol Hypertens* (2009), 18(4): 298-302.
- 11) Lin C et al.: Sclerostin mediates bone response to mechanical unloading through antagonizing Wnt/beta-catenin signaling. *J Bone Miner Res*, (Oct 2009); 24(10): 1651-61.

【生产企业及售后服务单位】

生产者名称: BIOMEDICA GRUPPE
生产者/生产场所地址: Biomedica Medizinprodukte GmbH&Co KG,A-1210 Wien,Divischgasse4
电话: +43/1/29107-45
传真: +43/1/29107-85
网址: www.bmgrp.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