

抗酒石酸酸性磷酸酶 5b (TRACP 5b) 定量测定小鼠血清

简介

只供研究使用，不用于诊断程序。

MouseTRAP™测试是定量检测小鼠血清样本中抗酒石酸酸性磷酸酶 5b 含量的固相酶联免疫活性测定。

概述和解释

TRAP是破骨细胞骨重吸收中表达并被释放进入血液循环。因此，血清TRAP被认为是一个骨吸收速率的有用标志物。然而，有一些问题阻止特异性TRAP分析的发展，包括在血液循环中出现另外一些酸性磷酸酶的干扰。

MouseTRAP™分析方法是一个特异性检测小鼠破骨细胞分泌到循环中的TRACP 5b。并且，MouseTRAP™只检测刚进入循环之内有活性的TRACP分子。这分析方法不会检测到循环中没有活性的TRACP分子或碎片。因此，MouseTRAP™分析方法能准确评估在样本采集时的骨吸收速率的数量。

方法描述

MouseTRAP™分析使用准备的多克隆抗体，是使用重组老鼠TRACP(2)作为抗原产生的。在测试中，抗体在包被有抗兔IgG的微量孔中孵育。经过在洗涤之后，标准，质控和血清样本在微量孔中孵育，并且测定TRACP 5b活性是检测显色底物酶生成的颜色。反应被终止，反应混合物的吸光度在微量板读数仪上读取，颜色的强度与样本中TRACP 5b活性的数量成正比关系。

警告和预防

MouseTRAP™的分析方法仅用于研究使用，不能在人类或其它动物内使用。这产品必须严格按照试剂盒内附的说明书内所述的操作一致。如果不遵从使用说明的用法而产生废物导致出现任何的损失或损害(除法令所需要)，IDS公司将不负任何责任。

注意：试剂包含有动物成份物质。处理试剂时应将试剂作为有传染性的物质处理。

适当的预防和好的实验室操作习惯必须在试剂盒的保存，使用和处理时使用。处理试剂时应按当地的规定程序处理。

叠氮化钠

试剂盒内的一些试剂包含作为防腐剂的叠氮化钠，它可与铝、铜或者黄铜铝制品形成高爆炸性的金属叠氮化物。在处理时，用大量的水冲以防止生成金属的叠氮化物。

0.32M氢氧化钠

终止液[NaOH]包含0.32M的氢氧化钠；

R36/38 刺激眼睛和皮肤；

S26 如果接触到眼睛，马上用大量的水冲洗并且寻求医生建议；

S37/39 穿戴适当的手套和眼睛/面部的防护罩。

试剂预处理

标准 [CAL]和质控 [CTRL]：标准 [CAL]和质控 [CTRL]提供的是干粉形式。用 0.5mL 的蒸馏水或者去离子复溶，将盖子重新盖上在室温下静置 10-15 分钟，反复颠倒几次确保复溶完全。

如果标准和质控不止使用一次，要将他们冰冻保存（建议超过一个星期的保存要放在-70°C下保存）。

抗鼠 TRAP 抗体：抗鼠 TRAP 抗体 **Ab** 提供的是干粉形式。用 10.5mL 的蒸馏水或去离子水重溶，将盖子重新盖在室温下静置 15 分钟，反复颠倒几次确保复溶完全。

底物溶液：在使用之前准备。二片底物 **SUBS | pNPP** 用 10mL 底物缓冲液溶解（一片用半瓶 5mL 溶解）。底物溶液如果要多次使用，要避免冰冻保存。

洗液缓冲液：每瓶洗液浓缩缓冲液 **WASHBUF | 25x** 加入到 960mL 的蒸馏水或去离子水溶解并混匀。

其它试剂可直接使用。所有试剂在使用之前静置到室温。试剂在使用前反复颠倒数次确保混匀。

效期和试剂保存

试剂盒如果保存正确则可稳定至有效期。所有试剂在2-8°C下保存。

样本收集和保存

这个分析要使用血清样本。样本在收集后马上进行离心分离。长期保存，保存在-80°C。避免反复冻溶样本。

操作程序

提供的物质

1. **CAL | 0-4** – 标准 (**REF SB-TR103 01A - SB-TR103 01E**) :
干粉Tris-缓冲液盐包含重组MouseTRAP和蛋白有0.09%的叠氮化钠。在瓶子的标签上已有打印好的每瓶准确的标准值，每瓶0.5 mL，每盒5瓶。
2. **Ab** – 抗-鼠TRAP 抗体 (**REF SB-TR103 02**):
干粉Tris-缓冲液盐包含抗-鼠TRAP抗体，蛋白，稳定剂和0.05%叠氮化钠。每瓶10 mL。
3. **MICROPLAT** – 抗体包被板 (**REF SB-TR103 02W**) :
微量板被抗兔IgG多克隆抗体连接到聚苯乙烯微量孔的内部表面，8X12板条孔带干燥剂。
4. **CTRL** – 质控 (**REF SB-TR103 05**) :
干粉Tris-缓冲液盐包含重组MouseTRAP和蛋白有0.09%的叠氮化钠。在瓶子的标签上已有打印好的每瓶准确的标准值，每瓶0.5 mL。
5. **NaOH** – 终止液 (**REF SB-TR000 06**):
0.32M氢氧化钠，每瓶6 mL。
6. **RELEASREAG** – 释放剂 (**REF SB-TR103 07**):
从结合蛋白中分离TRAP特有的试剂。每瓶4 mL。
7. **SUBS | pNPP** – 底物块 (**REF SB-TR000 08**):
pNPP 2片。
8. **SUBSBUF** – 底物缓冲液 (**REF SB-TR000 08B**):
醋酸钠缓冲液，每瓶10 mL。
9. **WASHBUF | 25x** – 浓缩冲洗缓冲液 (**REF SB-TR000 09**):
Tris-缓冲液包含吐温20，每瓶40 mL。
10. 塑料胶板纸

需要的但没有提供的物品

1. 0.9% NaCl。
2. 精确可调整的加样器 20 μ L, 25 μ L, 50 μ L, 100 μ L, 500 μ L, 5 mL。
3. 精确可调的多道加样器 25 μ L, 50 μ L and 100 μ L。
4. 全自动洗板机 (可选配)。
5. 微量板读数仪和数据处理系统。

操作程序

将所有的试剂恢复到室温。按准备试剂里所描述的那样准备试剂。

将所需的微量板条装到板条架上。推荐双份检测。将剩下的板条放回原装口袋中并重新封好。不要取更多的板条，这样就能在30分钟内处理好。注意！确保在包装内的板条在密封保存期间干燥。

1. 加**100 µL**的抗-MouseTRAP抗体[Ab]到入到已有抗体包被的微量板孔[MICROPLAT]中。
2. 在室温(20-24°C)下孵育60分钟并振荡(大约950rpm)。
3. 用冲洗液清洗所有微量孔：
 - a) 全自动洗板机：设定洗板机每个孔至少**300 µL**的冲洗量，四次加满和吸干。
 - b) 手工冲洗：轻轻的颠倒板架使孔内的液体倒出，加入**250 µL**的冲洗缓冲液到所有的孔中，倒出并重复三次。在进行下一步操作时，将微量板翻转在滤纸上轻打，以确保吸干微量孔内多余的冲洗液。
4. 加**100 µL**的标准[**CAL**]或质控[**CTRL**]到相应的抗体包被的孔中[MICROPLAT]中，双份检测。
5. 加**75 µL**的0.9% NaCl和**25 µL** 样本到相应的有抗体包被的微量孔[MICROPLAT]中，双份检测。
6. 使用多通道的加样枪，加**25 µL**的释放剂[**RELEASREAG**]到所有孔中。
7. 在室温下(20-24°C)孵育60分钟并振荡(大约950rpm)。
8. 重复第三个冲洗步骤。
9. 用多通道加样枪加入**100 µL**的新鲜配置的底物溶液到所有的孔中。
10. 用塑料胶纸板将板条盖上，在**37°C**下孵育2小时。
11. 用多通道加样枪加**25 µL**的终止液[**NaOH**]到所有的孔中，并确保与孔内溶液混匀。
12. 加入终止液后的30分钟内，使用微孔板读数仪在**405 nm**下测量所有孔的吸光度。

质量控制

质控规则使用的质控样本要求几种水平的分析物，以确保每天的结果在可接受的范围内。提供一盒试剂足够的质控。质控应作为未知物进行检测。质量控制图应按照测试的结果进行绘画。

结果计算

绘制每个标准的吸光度均值在纵座标与浓度值在横座标的对数相关图。从标准曲线图中读出质控与未知样本的U/L结果。样本的结果乘以稀释倍数。

要得到每个样本的**MouseTRAP**结果，从曲线上得到的结果乘以稀释倍数(1:4)。

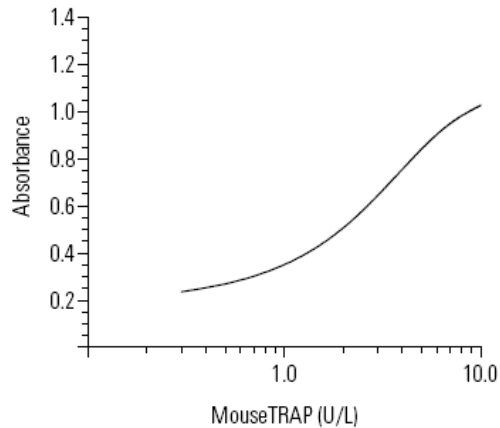
样本数据分析

这些数据仅用于作为例子介绍，不能用于任何样本结果的计算。每个标准的准确浓度已打印在瓶子的标签上。

孔	描绘	吸光度	平均吸光度	结果U/L
A1, A2	标准 0 0 U/L	0.180 0.174	0.177	
A3, A4	标准1 0.3 U/L	0.240 0.234	0.237	
A5, A6	标准2 1.0 U/L	0.351 0.351	0.351	
A7, A8	标准3 3.0 U/L	0.649 0.640	0.645	
A9, A10	标准4 10.0 U/L	1.032 1.021	1.026	
A11, A12	样本	0.424	0.430	1.5

		0.436	
--	--	-------	--

典型的标准曲线:



检测性能数据

灵敏度

灵敏度是0.1 U/L。

精密度

分析的批内变异为<6.5%，批间的变异为<8%。

参考文献

1. Halleen JM, Alatalo SL, Suominen H, Cheng S, Janckila AJ, Väänänen HK (2000). Tartrate-Resistant Acid Phosphatase 5b: A Novel Serum Marker of Bone Resorption. *J. Bone Miner. Res.* 15(7), 1337-1345.
2. Marshall K, Nash K, Haussman G, Cassady I, Hume D, de Jersey J, Hamilton S (1997). Recombinant human and mouse purple acid phosphatases: expression and characterization. *Arch Biochem Biophys* 15:230-236.

操作简介



↓
洗板
↓
加100 μL 底物溶液
↓
孵育: 2 hours @ 37°C.
↓
加25 μL 终止液 **NaOH**
↓
读板 @ 405nm.



Immunodiagnostic Systems Ltd (IDS Ltd).

UK Immunodiagnostic Systems Ltd (IDS Ltd), 10 Didcot Way, Boldon Business Park, Boldon, Tyne & Wear, NE35 9PD Tel: +44 (0) 191 519 0660 • Fax: +44 (0) 191 519 0760 • e-mail: marketing@idsltd.com • www.idsltd.com

USA Immunodiagnostic Systems Inc (IDS Inc.), P.O. Box 17063, Fountain Hills, AZ 85269-7063 Tel: 480-836-7435 • Fax: 480-836-7437 • e-mail: info@idsinc.us.com • www.idsinc.us.com

Germany Immunodiagnostic Systems GmbH (IDS GmbH), Mainzer Landstrasse 49, 60329 Frankfurt am Main Tel: +49 (0) 69 3085-5025 • Fax: +49 (0) 69 3085-5100 • e-mail: info@ids-de.com • www.ids-de.com

France Immunodiagnostic Systems EURL (IDS EURL), 116 avenue du General Leclerc, 75014 Paris Tel: +33 (0)1 56 53 39 32 • Fax: +33 (0)1 56 53 93 31 • e-mail: info@ids-eurl.com • www.ids-eurl.com

中国总经销商: 北京荣志海达生物科技有限公司, 北京市海淀区永定路88号长银大厦12层B12室 • 电话: +86 10 58 895646 +86 2032293178 • 传真: +86 10 58895611 +86 20 32293178
• 电子邮箱: info@rz-biotech.com • 网址: www.rz-biotech.com

