

Code No. MK101

研究用

Takara

Procollagen type I C-peptide
(PIP) EIA Kit (Precoated)

说明书

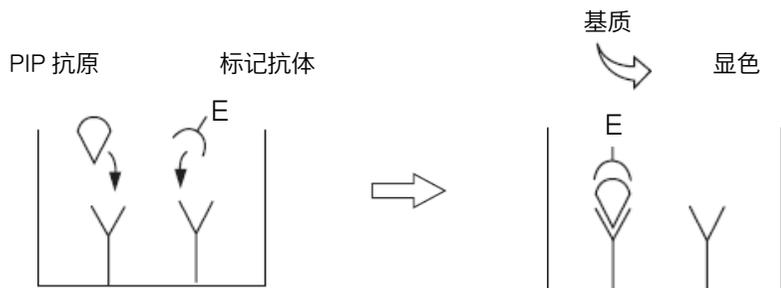
目 录

内 容	页 码
● 制品说明	1
● 制品内容	1
● 保 存	1
● 试剂盒外所需主要试剂及器材	1
● 使用目的	1
● 使用方法	2
● 性 能	3
● 测定时的基本资料	4
● 使用注意事项	9
● 关联产品	9
● 参考文献	9

● 制品说明

本制品是定量检测血浆、血清、培养细胞提取物、细胞培养上清和其他生物体液中 I 型前胶原 C 末端肽含量的试剂盒，可对骨代谢进行量化评价。I 型胶原蛋白是由纤维芽细胞、软骨细胞、成骨细胞分泌的蛋白质，占骨基质有机成份的 90% 以上。在细胞内合成的 I 型前胶原分泌到细胞外，在肽链内切酶的作用下，其氨基端和羧基端附加的前肽被切断，形成原胶原蛋白，原胶原分子聚合成胶原纤维后构成细胞外基质。被切断的游离的前肽是可溶性的，可作为反映生物体内胶原蛋白合成量的生物化学指标。本制品是利用 I 型前胶原 C 末端肽（简称 PIP）特异性单克隆抗体对 I 型前胶原 C 末端肽进行定量的试剂盒。

检测原理图



● 制品内容

1. Antibody Coated Microtiterplate (96 wells : 8 wells × 12 strips) 包被了抗 PIP 的单克隆抗体板	1 plate
2. Antibody-POD Conjugate (Lyophilized) 含冻干的辣根过氧化物酶(POD)连接的 PIP 鼠源单克隆抗体	for 11 ml
3. Standard 冻干的 I 型前胶原 (640 ng)	for 1 ml
4. Sample Diluent 1% BSA containing PBS (含有防腐剂)	11 ml × 2
5. Substrate Solution (TMBZ) 3, 3', 5, 5' -Tetramethylbenzidine solution	12 ml

● 保 存: 4°C

● 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 1N 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)

● 使用目的

用于人、牛、狗、马、猴培养细胞及其培养上清、血液中的前胶原 C 末端肽的测定。

注：本制品用于研究，不可用于疾病的诊断。

● 使用方法

1. 检测样品

- 检测样品是无血清培养细胞提取液、无血清培养上清*和血清（人血清需要稀释 5~10 倍）。
 - *：添加了胎牛血清、马血清等动物血清的培养上清会导致很高的背景，影响检测结果。建议尽可能在无血清培养条件下进行实验。必须使用含血清的培养基时，请参照“测定时的基本资料 6.培养细胞上清的检测例 3”。
- 检测样品 2~10℃保存，保存时间超过 12 小时，要冷冻保存。
- 检测样品的稀释请参考后面的稀释曲线。如果检测样品浓度过高，建议将样品用 Sample Diluent 3~4 倍稀释后再检测。

2. 试剂的制备

- 抗体包被板 ((1) Antibody Coated Microtiterplate)
使用前放置至室温后再开封。
- PIP 标准液
在(3)Standard 中加入 1 ml 蒸馏水后使其溶解，制备成 640 ng/ml 的 PIP 标准液。
用(4)Sample Diluent 将 640 ng/ml 的 PIP 标准液梯度稀释为 320、160、80、40、20、10 ng/ml。0 浓度使用(4)Sample Diluent。PIP 标准液(640 ng/ml)可-20℃保存 1 个月，性能稳定。
- 标记抗体
在(2) Antibody-POD Conjugate 中加入 11 ml 蒸馏水后使其溶解。
溶解后 4℃保存 1 周性能稳定。1 个月以上要-20℃保存。
- 基质液 ((5) Substrate Solution (TMBZ))
使用前放置至室温后可直接使用。使用前确认基质液颜色是否变为深蓝色。基质液与金属离子反应会显色，注意不要混入自来水。
多次分开使用时，按照所需量提前分装。
- 反应终止液(Stop Solution)
可直接使用 Wash and Stop Solution for ELISA without Sulfuric Acid (Code No. MK021) 的 Stop Solution。
本制品是不含 1 N H₂SO₄ 的过氧化物酶反应终止液。
注：溶液粘性大，添加后用 Plate mixer 充分混合。
- PBS 洗液
将 Wash and Stop Solution for ELISA without Sulfuric Acid (Code No. MK021) 中的 10×PBS (50 ml) 用蒸馏水稀释至 500 ml，混匀后作为 PBS 洗液使用。
注：本制品不使用 Code No. MK021 中含有的 Tween 20。

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放置至室温后，混合均匀后再使用，混合时避免产生气泡。
- a. 在微量滴定板的各孔中分别加入 100 μl 标记抗体后，将 20 μl 提前制备好的各浓度 PIP 标准液和检测样品用微量移液枪加入到各孔中 (N=2)，37℃反应 3 小时。样品的添加在 5 分钟内完成（第一反应）。
建议将 PIP 标准液的梯度稀释液添加在第 1 列和第 12 列，取平均值后绘制标准曲线，第 2 列和第 11 列用于检测样品的定量。
- b. 弃除反应液，用 PBS 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 15 分钟（第二反应）。
- c. 按照(5) Substrate Solution (TMBZ) 的添加顺序在各孔中分别加入 100 μl 的 Stop Solution* 终止反应后充分混合。
 - *：Stop Solution 粘性大，添加后用 Plate mixer 充分混合。

- d. 蒸馏水作为对照调零后，在 450 nm 处测定吸光度值。反应终止后 1 小时内显色稳定。
- e. 以横轴表示的各 PIP 标准液浓度和纵轴相对应的吸光度值绘制标准曲线后，根据检测样品的吸光度值可求出相应的 PIP 浓度。

<注意>

使用本产品进行 EIA 分析时，建议在操作 a 的各孔中添加标记抗体和 PIP 标准液或检测样品后充分混合，但 37°C 反应 3 小时应处于静置状态。加热或室温反应时，在平板上覆盖一层膜以防止溶液的蒸发。

● 性能

1. 标准曲线

下面是标准曲线例。为了获得准确的检测结果，测定时需绘制标准曲线。

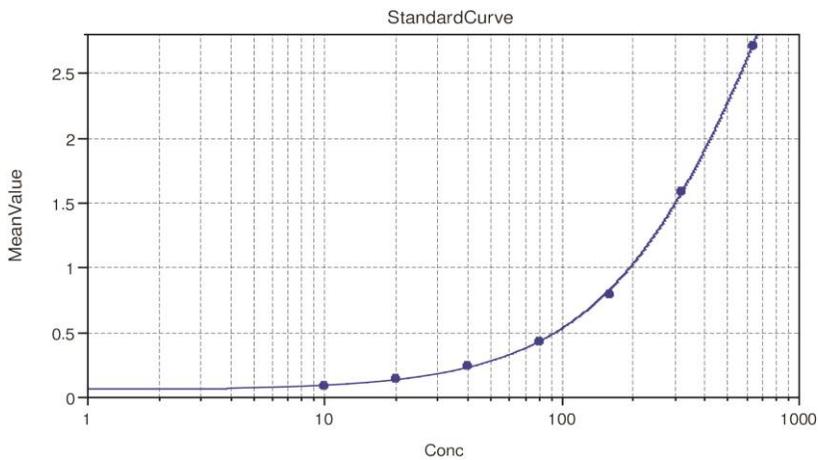
最低检出灵敏度：10 ng/ml

Curve Fit: 4-Parameter

Corr. Coeff: -1.00

$$y = (A-D) / (1 + (x/C)^B) + D$$

$$A = 0.0491 \quad B = 0.933 \quad C = 542. \quad D = 4.34$$



PIP (ng/ml)	640	320	160	80	40	20	10	0
A ₄₅₀	2.709	1.593	0.797	0.435	0.240	0.141	0.087	0.040

2. 再现性

同时再现性

将人血清稀释为 3 种浓度后作为对照进行了再现性实验。(n=16)

PIP EIA 同时再现性 (n=16)

	平均值 (ng/ml)	标准偏差 (ng/ml)	CV 值 (%)
Control A	484.8	35.64	7.4
Control B	87.3	6.282	7.2
Control C	31.7	1.411	4.5

日差再现性

将 3 种浓度的对照进行了 3 天定量的再现性实验。

PIP EIA 日差再现性 (n=3)

	平均值 (ng/ml)	标准偏差 (ng/ml)	CV 值 (%)
Control A	466.1	20.25	4.3
Control B	90.7	4.349	4.8
Control C	29.6	1.873	6.3

3. 添加回收试验

加入等量的各浓度检测样品后，通过理论值和实测值对回收率进行了调查。

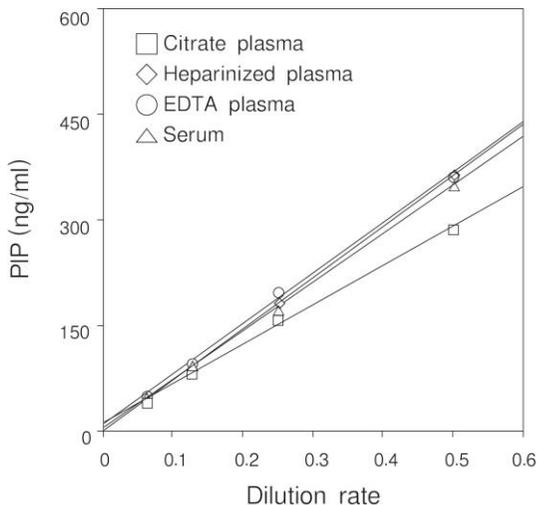
样品 A	样品 B	A+B 实测值	A+B 理论值	回收率 (%)
390.8	0.0	217.3	195.4	111
390.8	390.8	410.0	390.8	105
390.8	219.8	328.7	305.3	108
390.8	110.8	272.8	250.8	109
390.8	55.9	245.7	223.3	110
390.8	31.4	238.8	211.1	113
219.8	0.0	118.1	109.9	107
219.8	219.8	272.5	219.8	124
219.8	110.8	179.6	165.3	109
219.8	55.9	145.0	137.8	105
219.8	31.4	126.2	125.6	100
110.8	0.0	57.5	55.4	104
110.8	110.8	111.6	110.8	101
110.8	55.9	99.5	83.3	119
110.8	31.4	83.7	71.1	118
55.9	0.0	25.6	27.9	92
55.9	55.9	56.6	55.9	101
55.9	31.4	41.4	43.6	95
31.4	0.0	14.3	15.7	91
31.4	31.4	30.4	31.4	97

单位: ng/ml

● 测定时的基本资料

1. 健康人血浆、血清样品的稀释曲线

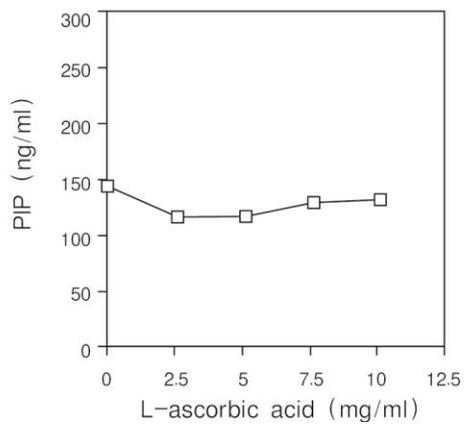
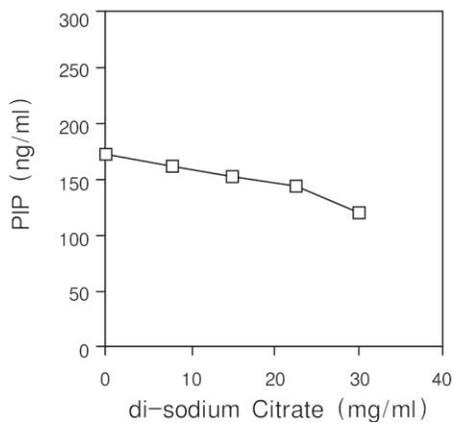
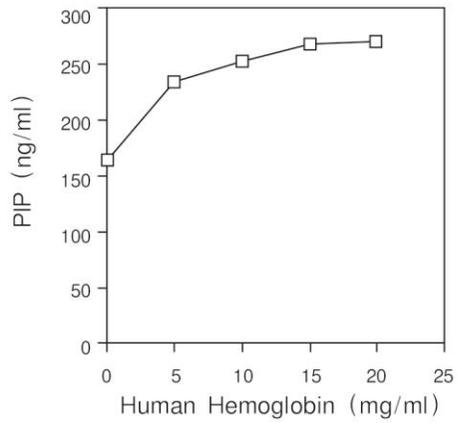
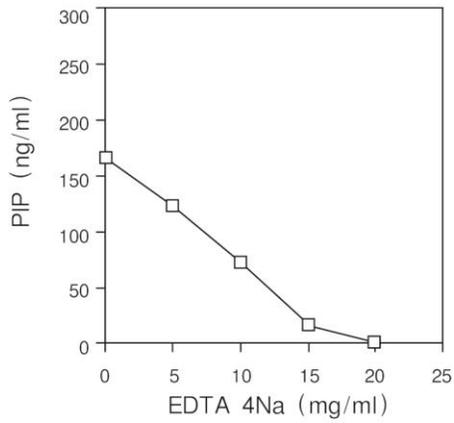
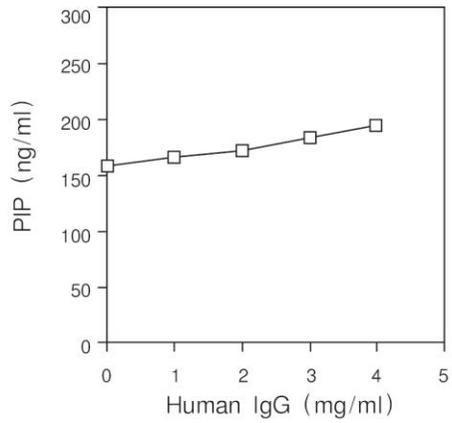
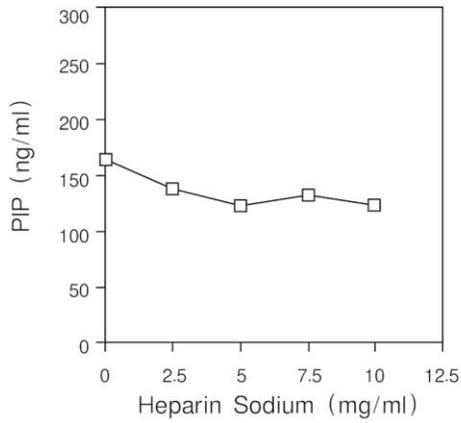
同一个人不同采血条件（抗凝血剂）下同时采取的血液样品的稀释曲线。

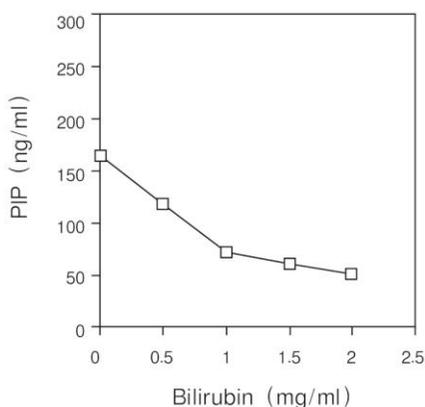
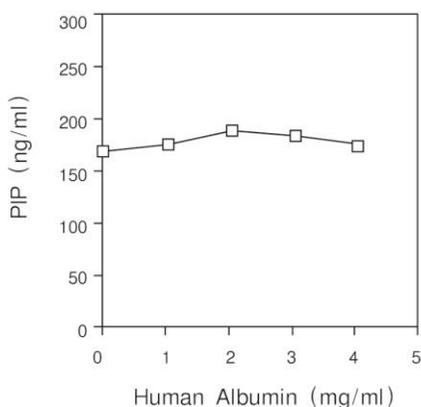
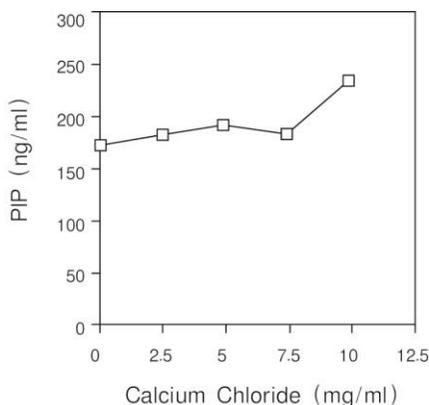
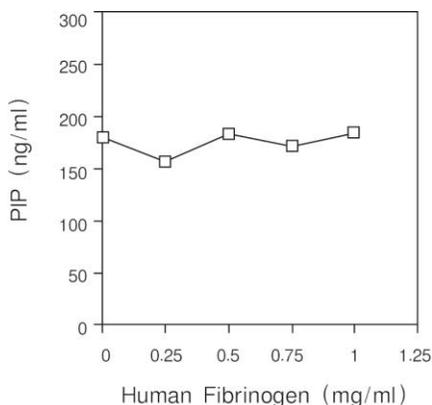


$y=562.087x+10.361$	$r=0.998$	Citrate plasma
$y=737.475x - 1.196$	$r=1.000$	Heparinized plasma
$y=715.951x+8.274$	$r=0.998$	EDTA plasma
$y=692.856x+4.487$	$r=1.000$	Serum

2. 共存物的影响

在 4 体积的检测样品中添加 1 体积的共存物后对反应体系的影响。





3. Two-step法的应用可提高检测灵敏度

本试剂盒中含有的试剂可直接用于Two-step法。Two-step法可有效用于检测样品中抗原含量低，或检测样品中含有叠氮化钠 (NaN₃) 等对(2) Antibody-POD Conjugate有阻害作用物质时。

方法：

将(3) Standard (640 ng) 用(4) Sample Diluent稀释至160 ng/ml后，以160 ng/ml为最高浓度进行梯度稀释后作为标准品。

将100 μl 稀释后的各浓度标准品和检测样品分别加入到抗体包被板中，37℃反应2小时。建议样品的添加在5分钟内完成。

弃反应液，用PBS清洗3次。

将100 μl Antibody-POD Conjugate分别加入到各孔中，37℃反应1小时。

弃反应液，用PBS清洗4次。

将100 μl (5) Substrate Solution (TMBZ) 分别加入到各孔中，室温 (20~30℃) 反应15分钟 (显示反应)。

按照(5) Substrate Solution (TMBZ) 的添加顺序在各孔中分别加入100 μl的Stop Solution 终止反应后充分混合。

以蒸馏水作为对照调零后，在450 nm处测定吸光度值。反应终止后1小时内显色稳定。

以横轴表示的各PIP标准液浓度与纵轴相对应的吸光度值绘制标准曲线后，根据检测样品的吸光度值可求出相应的PIP浓度。

4. 培养细胞上清的检测

例 1：人间充质干细胞：人骨髓间质干细胞（hMSC）向成骨细胞的诱导分化监测

以诱导人间充质干细胞（Lonza 公司）（Code No. PT-2501）向成骨细胞分化过程中的培养上清产生的 I 型前胶原进行不同时间的检测。对 Control 细胞和培养细胞的培养上清进行一系列稀释倍数研讨后，最终检测样品以 3^6 和 3^7 的稀释倍数进行了检测。下表是使用人间充质干细胞专用培养基 MSCGM 培养基（B）（Code No. PT-3001）时的 PIP 浓度检测值。

间质干细胞（hMSC）向成骨细胞的诱导分化监测 单位：ng/ml

样品名	检测倍数	实测换算值		(A) - (B)
		样品 (A)	MSCGM 培养基 (B)	
hMSC 3 day Control	$\times 3^6$	16.67	2.72	13.95
	$\times 3^7$	4.73	0.00	4.73
hMSC 3 day 成骨细胞的诱导分化	$\times 3^6$	19.24	2.72	16.52
	$\times 3^7$	8.56	0.00	8.56
更换培养基				
hMSC 7 day 成骨细胞的诱导分化	$\times 3^6$	82.18	2.72	79.46
	$\times 3^7$	35.57	0.00	35.57
hMSC 10 day 成骨细胞的诱导分化	$\times 3^6$	63.67	2.72	60.95
	$\times 3^7$	31.74	0.00	31.74
更换培养基				
hMSC 14 day 成骨细胞的诱导分化	$\times 3^6$	111.50	2.72	108.78
	$\times 3^7$	54.51	0.00	54.51
更换培养基				
hMSC 21 day 成骨细胞的诱导分化	$\times 3^6$	161.10	2.72	158.38
	$\times 3^7$	74.44	0.00	74.44

<结果>

结果表明：诱导分化的同时，产生的前胶原量也随之增多。

5. 培养细胞上清的检测例 2：人成骨细胞（NH0st）培养上清中 I 型前胶原生成量的检测

将正常人成骨细胞（Lonza 公司）（Code No. CC-2538）在含 10% 牛血清（FCS）的专用培养基（OGM）中培养后，对上清中的胶原量变化进行了监测。每周更换一次培养基。

NHOst培养上清

单位: ng/ml

样品名	检测倍数	实测换算值		(A) - (B)
		样品 (A)	MSCGM 培养基 (B)	
NHOst day 10	× 20	111.50	41.66	69.84
	× 40	74.88	20.76	54.12
NHOst day 14	× 20	181.80	41.66	140.14
	× 40	108.10	20.76	87.34
NHOst day 35	× 20	393.40	41.66	351.74
	× 40	201.60	20.76	180.44

<结果>

检测样品的稀释倍数是根据预研讨实验进行了 20 倍和 40 倍稀释。

结果表明稀释 20 倍和 40 倍可减少培养基中 FCS 来源牛抗原的影响。随着细胞生长, 培养上清中的前胶原浓度也随之上升。

6. 培养细胞上清的检测例3: 牛血清 (FCS) 中含有的牛抗原的影响

使用本试剂盒检测培养上清中的检测样品时, 需要考虑培养基中添加的牛血清来源的牛PIP抗原对检测样品产生的背景影响。对不同批次的牛血清PIP浓度的测定值进行了调查。在各公司的RPMI1640培养基中添加10%FCS后进行了PIP浓度检测。同时对含10%FCS细胞培养上清中的PIP浓度也进行了检测。

10%FCS/ RPMI1640培养基 单位: ng/ml

FCS	稀释倍数	实测换算值
A公司	× 3 ³	69.61
	× 3 ⁴	21.14
B公司	× 3 ³	88.04
	× 3 ⁴	29.67
C公司	× 3 ³	73.39
	× 3 ⁴	29.04
D公司	× 3 ³	109.40
	× 3 ⁴	50.50

10%FCS/ RPMI1640培养基的细胞培养上清 单位: ng/ml

FCS	稀释倍数	实测换算值
培养基	× 3 ³	70.93
	× 3 ⁴	25.49
MES.SA 人子宫瘤	× 3 ³	143.60
	× 3 ⁴	73.92

<结果>

前胶原产生量多的细胞 3³ 稀释后的 PIP 浓度检测值减去纯培养基的 PIP 浓度检测值后可对含血清的细胞培养上清中的 PIP 浓度进行检测。同时, 即使牛血清存在批次差, 含 10%FCS 培养基中的 PIP 也无明显浓度差。上述稀释倍数以上的培养基可抑制牛抗原产生的背景影响。

● 使用注意事项

1. 请使用同一批次的试剂盒和试剂，不同批次的试剂盒和试剂不要混用。
2. 试剂在保存或反应中要避免光照。
3. (5) Substrate Solution (TMBZ) 和 Stop Solution 不能使用带有金属配件的移液枪。
4. (5) Substrate Solution (TMBZ) 和 Stop Solution 避免直接接触手和粘膜。
5. 避免使用着色的 Substrate Solution (TMBZ) 。
6. 反应时由于受反应时间和温度的影响，检测时请绘制标准曲线。
7. 使用血液样品时要充分注意。

● 关联产品

Wash and Stop Solution for ELISA without Sulfuric Acid (Code No. MK021)

● 参考文献

- 1) Taubman M B, *et al* . *Science*. **186** (1974): 1115.
- 2) Parfitt A M, *et al* . *J Bone Mineral Res* . (1987) **2**: 427.
- 3) Savolainen, E.R., *et al* . (1984) *Alcoholism*. **8**: 384.
- 4) Niitsu Y, *et al* . *J Gastroenterol Hepatol* . (1988) **3**: 159.
- 5) Niitsu Y, *et al* . *Br J Cancer*. (1988) **57**: 79.
- 6) Haga S, *et al* . *Med Pharm* . (1990) **24**: 1047.
- 7) Kanayama N and Terao T. *Gynecol Obste Invest* . (1992) **34**: 24–26.

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.takarabio.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: <https://www.takarabiomed.com.cn>