

# 使用说明书

## **DRG® CA 15-3 癌抗原 ELISA 试剂** **(EIA-3941)**

### **1. 简介 (Introduction) :**

DRG® CA 15-3 癌抗原标志物酶联免疫吸附试剂 (EIA-3941) 为量化测定血清和血浆内 CA 15-3 的含量提供了工具。该试剂只可作为体外诊断之用。

乳腺癌是女性中最常见的恶性肿瘤，其癌细胞的转移可在肿瘤发展的各个阶段发生。研究发现有 70% 的病例，其转移瘤细胞对用来进行系统治疗的细胞毒性药物和/或内分泌药物的治疗具有非常显著的疗效，故而早期发现肿瘤及肿瘤的浮法对乳腺癌病人的管理至关重要。

对于曾经接受过乳腺癌临床 II 期和临床 III 期治疗的病例的复发诊断，紧紧依靠常规的临床诊断方法是不够的，检测病人血清中的肿瘤标志物的浓度变化，例如 CA 15-3 (DRG® CA 15-3 ELISA 试剂)，可以有效地帮助临床诊断。

DRG® CA 15-3 ELISA 试剂使用的是从人乳腺癌细胞中表达的，可对抗 DF3 反应决定位点的两个单克隆抗体 (115D8 和 DF3)。115D8 抗体通过抗人球状脂肪乳膜抗原而获得；而 DF3 抗体则是通过对抗富含细胞膜的人乳腺癌细胞获得。实验结果表明，乳腺癌病人的血清中 DF3 反应决定位点的含量经常有所增加。当然，在其他恶性肿瘤 (如肺癌) 和一些非肿瘤性疾患中也可发现此一现象。大多数的正常人群或非恶性肿瘤的人群中，CA 15-3 测量值是不升高的。

(注：CA 15-3 测量值在用不同的检测方法和不同厂家的试剂时，由于差异的方法和试剂特性所测量出的结果也不尽相同。因此，实验室出报告时，一定要注明所使用的实验方法。不同实验方法所得到的结果不可相互比较)

### **2. 测试原理 (Principle of the test) :**

DRG® CA 15-3 肿瘤标志物酶联免疫吸附试剂 (EIA-3941) 是以夹心法为基础的 ELISA 试剂盒。包被板的微孔中包被有直接抗 CA 15-3 分子特异抗原的单克隆抗体。含有内源 CA 15-3 病人样本经稀释后与含有挂着辣根过氧化物酶的抗 CA 15-3 抗体单克隆抗体的酶联物一起在包被有直接抗 CA 15-3 分子特异抗原单克隆抗体的微孔内温育。温育完成后，未结合的酶联物将被冲洗掉。结合的过氧化物酶的总量与 CA 15-3 含量成正比。在加入底物液体后所产生的光强度与病人样本中 CA 15-3 的含量成正比。

### **3. 注意事项 (Precautions) :**

- 本试剂盒只适用体外诊断；
- 有关本试剂盒中可能含有的废毒物信息，请参阅“实验材料安全数据册”；

- 本试剂盒内有可能存在的人类血清和血浆均经过特殊处理，并经过 FDA 批准的检测方法证实对 HIV I/II, HBsAg 和 HCV 具有阴性反应。尽管如此，所有的试剂在使用和废弃时，均应视为潜在的生物废弃物而加以特殊处理；
- 避免接触含有 0.5M 硫酸液体的反应中止液，以免皮肤灼伤；
- 避免以嘴吹吸移液管，并严禁皮肤和粘膜与试剂及样品接触；
- 严禁在工作台附近抽烟，摄取食物及饮料，或使用化妆品；
- 在样品和试剂盒的操作过程中要穿戴胶皮手套。被微生物污染的样品和试剂有可能带来假性结果；
- 操作过程要严格遵照国家对生物废毒品处置和实施的有关规定进行；
- 不要使用已过期的试剂盒；
- 所有液体量均要按照手册规定予以施加。只有使用校准后的移液器和酶标仪才能得到最满意的实验结果；
- 避免混合使用不同批号产品的试剂盒。尽管是同一批号的包被板也不要交叉使用。试剂盒有可能在运输或储藏的过程中处于不同的物理条件，因而包被板的结合特性有可能会有微小的改变；
- 化学物质和伊使用过的试剂应视为生物废毒品，并要严格遵照国家对生物废毒品处置和实施的有关规定进行处理；
- “实验材料安全数据册”可向 DRG 公司索取；
- “实验材料安全数据册”符合欧盟“Guideline 91/155EC”的有关规定。

## 4. 试剂盒组成 (Kit components) :

### 4.1 试剂盒内容 (Contents of the kit) :

1. 包被板/孔 (Microtiter wells) , 12x8 可分离 96 孔, 微孔内包被抗 CA 15-3 单克隆抗体;
2. 零标准液, 1 小瓶, 3 ml, 即用  
内含有 0.010% Methylisothiazolone 和 0.015% Bromonitrodioxane 保护液;
3. 标准液 (Standard) (标准液 1-4) , 共 4 小瓶, 每瓶 0.5 ml  
浓度: 25; 50; 100; 200 U/ml  
内含有 0.010% Methylisothiazolone 和 0.015% Bromonitrodioxane 保护液;
4. 对照液 (Control) , 1 小瓶 (冷冻粉) , 0.5 ml (详见“试剂制备”) 并含有 0.3%Proclin 保护液。对照液的数值和范围请参照标签或 QC 手册;
5. 实验缓冲剂 (Assay Buffer) , 1 小瓶, 30 ml,  
内含有 0.010% Methylisothiazolone 和 0.015% Bromonitrodioxane 保护液;
6. 酶联物 (Enzyme conjugate) , 1 小瓶, 14 ml, 含有挂着辣根过氧化物酶的抗 CA 15-3 抗体的单克隆抗体, 内含有 0.010% Methylisothiazolone, 0.010% Bromonitrodioxane 和 10ppm Proclin 保护液;
7. 底物液 (Substrate solution) , 1 小瓶, 14 ml, TMB, 即用;

8. 反应终止液 (Stop solution), 1 小瓶, 14 ml, 内含 0.5 M 硫酸, 即用。操作时应避免接触反应中止液, 以免皮肤灼伤;
9. 清洗液 (Wash solution) (40 x 浓度), 1 小瓶, 30 ml, (详见“试剂制备”)

#### 4.1.1 其他所需仪器 (试剂盒中不包括):

- 酶标仪 (Microtiterplate calibrated reader) (450±10 nm);
- 校准的移液器 (Calibrated variable precision micropipettes);
- 吸水纸巾 (Absorbent paper);
- 蒸馏水 (Aqua distilled);

#### 4.2 试剂盒的稳定性及储存 (Storage and stability of the kit):

未开启的试剂盒如果在 2-8°C 温度下储存, 则可保证在有效期内试剂保持活性。不要使用过期的试剂盒。一旦试剂盒被打开, 则要保存在 2-8°C 冰箱内。包被板也要在 2-8°C 冰箱内保存。如果包被板的包装锡纸被打开后, 要小心重新密封。

#### 4.3 试剂制备 (Preparation of reagents):

所有试剂及相关仪器在使用前均须在室温条件下放置一定时间。

**对照液 (Control):** 以 0.5 ml 蒸馏水溶解标准液小瓶中的冷冻粉, 并放置至少 10 分钟。使用前要反复多次混均。(注: 重新使用的对照液要进行分装, 并放在 -20°C 条件下保存)

**清洗液 (Wash solution):** 取 30 ml 高浓度清洗液加入 1170 ml 去离子水中, 使最终体积成为 1200ml。(注: 室温条件下, 稀释的清洗液可稳定 2 个星期)

#### 4.4 试剂盒使用后的处置 (Disposal of the kit):

试剂盒使用后的处置须按照国家的有关规定。详情请参照第十三节的“实验材料安全数据册”

#### 4.5 试剂盒的破损 (Damaged test kits):

如果试剂盒或其内容物有严重的损坏, DRG 公司要求在收到该批货物之后的一个星期内接到书面通知及说明。严重损坏的试剂盒不能够再继续使用, 要放冰箱内直到问题得到解决。之后, 破损的试剂盒要按照国家的有关规定妥善处理。

## 5. 样品 (Specimen)

血清或血浆 (EDTA, 肝素抗凝血浆) 样品可用于本试剂盒的检测。

不要使用已溶血的, 黄疸和脂血样品。

(注: 含有叠氮化钠 (Sodium Azide) 的样品不可以在本实验中使用)

#### 5.1 样品收集 (Specimen collection):

**血清:** 静脉抽血, 待完全凝血后, 在室温条件下离心分离血清。在血液完全凝血后方可进行离心分离。如果病人曾接受抗凝治疗, 等待完全凝血的时间将会延长。

**血浆:** 抽血后全血应立即移入装有抗凝剂的离心管中进行离心处理。

### 5.2 样品储藏 (Specimen storage) :

使用前, 加上封盖后的样品在 2-8°C 状态下最多可存放 48 小时。如若要长时间保存, 样品要在-20°C 状态下冷冻, 且只能冷冻一次。使用前, 冷冻的样品须经反复摇动多次以化冻。

### 5.3 样品稀释 (Specimen dilution) :

在预实验中, 如发现样品的含量值高于标准液标准液 (Standard) 的最高值, 则样品需要用“0 标准液” (Zero Standard) 进行 10 倍或 100 倍的稀释后再按上述试验步骤重新测量。在计算原始样品的实际含量时, 要考虑稀释倍数。

下表是一简单的稀释

方法:

1:10 稀释	10 $\mu$ l (血清) + 90 $\mu$ l (0 标准液), 充分搅匀
1:100 稀释	10 $\mu$ l (1:10 稀释后血清) + 90 $\mu$ l (0 标准液), 充分搅匀

## 6. 实验步骤 (Test procedure)

### 6.1 总述 (General remarks) :

- 所有的试剂和样品在使用前要充分混均并保证没有泡沫, 并平衡至室温状态;
- 一旦实验开始, 所有的操作过程必须完整并无间断的一次完成;
- 为避免交叉感染, 在汲取每一种浓度的标准液, 对照液和样品时均要更换新的一次性使用的塑料加样头;
- 抗原抗体的免疫吸附反应取决于温育时间和温度。实验开始之前, 建议使所有的试剂和包被板/条的准备工作就绪, 以利实验进程顺利, 所有微孔的加样和反应时间要一致。
- 酶反应的基本原理: 酶反应与时间和温度成正性线性相关。

### 6.2 实验步骤 (Assay procedure) :

每一轮实验, 都须重新制作标准曲线 (Standard Curve) 。

1. 将所需数目的板条至于板架上;
2. 依次汲取 10  $\mu$ l 标准液 (Standards), 样品 (Samples), 和对照 (Controls) (每一次吸取均要置换一次性塑料加样头), 加样入第一排微孔中;
3. 在第一排微孔中加入 250  $\mu$ l 实验缓冲剂 (Assay Buffer), 充分搅匀 10 秒钟 (此步骤是否搅匀对于后面的实验结果甚为重要);
4. 重复上书“2, 3”步骤, 直到剩余的微孔 (第二至第十二排) 均加入了样品和实验缓冲剂 (Assay Buffer);  
(注: 在加样时, 各项要一排排地加入, 因为, 没有加入实验缓冲剂 (Assay Buffer) 的微孔经孵育后测量出的 CA 15-3 数值会升高)
5. 室温下温育 60 分钟 (无需覆盖微孔板);
6. 快速甩掉微孔内的遗留物, 每一微孔中加入 400 $\mu$ l 清洗液 (Wash solution) 清洗, 共三次, 而后在吸水纸巾 (Absorbent paper) 用力拍打板条, 以清除残留液体;

(本实验的敏感性和准确性很大程度上取决于是否正确地清洗微孔板)

7. 在每个微孔中各加入 100 $\mu$ l 酶联物 (Enzyme conjugate) ;
8. 室温下温育 30 分钟 (无需覆盖微孔板) ;
9. 快速甩掉微孔内的遗留物, 每一微孔中加入 400 $\mu$ l 清洗液 (Wash solution) 清洗, 共三次, 而后在吸水纸巾 (Absorbent paper) 用力拍打板条, 以清除残留液体;
10. 在每个微孔中各加入 100 $\mu$ l 底物液 (Substrate solution) ;
11. 室温下温育 30 分钟;
12. 在每个微孔中各加入 100 $\mu$ l 反应终止液 (Stop solution) 终止酶反应;
13. 加入反应终止液 (Stop solution) 后 10 分钟内, 在 450 $\pm$ 10 nm 波长下读取 OD 值。

### 6.3 计算结果 (Calculation of results) :

1. 计算每一组标准液 (Standards), 样品 (Samples), 和对照液 (Controls) 的吸光度平均值;
2. 建立标准曲线: 以标准液 (Standards) 浓度为 X 轴, 标准液 (Standards) 的光吸收值为 Y 轴, 画出标准曲线 (Standard Curve) ;
3. 用不同样品的平均光吸收值在标准曲线上确定相应的样品浓度;
4. 自动计算方法: 光度计可连接相应的计算软件 (如 4 Parameter Logistics Curve Fit), 自动计算样品浓度。
5. 样品的浓度可直接从标准曲线上得到。如果样品的浓度高于标准曲线上的最高浓度, 则样品需要再稀释。最后计算样品的浓度结果时不要忘记稀释倍数。

下表所列为以 DRG® CA 15-3 试剂盒所作出标准曲线的典型例子:

标准液	光吸收值 (450 nm)
0 标准液 ( 0 U/ml)	0.03
标准液 1 ( 25 U/ml)	0.83
标准液 2 ( 50 U/ml)	1.24
标准液 3 ( 100 U/ml)	1.60
标准液 4 ( 200 U/ml)	2.05

## 7. 期望值 (Expected Values)

每个实验室必须拥有自己的一套正常和异常病人的 ELISA 测量结果。

以下是利用 DRG 公司的 CA 15-3 ELISA 试剂对正常成年人测试所得到的结果:

测试人群	5%区间	95%区间
男性和女性	8.3 U/ml	33..8 U/ml

此结果很好的吻合了先前文献中所发表的测量值

## 8. 实验技术指标 (Assay Characteristics)

### 8.1 实验结果的动态范围 (Assay Dynamic Range)

本试验结果的测量范围: 0 – 200 U/ml

## 8.2 抗体特异性（交叉反应）（Specificity of Antibodies）

本试剂盒的交叉反应尚不明确。

## 8.3 分析灵敏度（Analytical Sensitivity）

用 20 个双份检测的“0 标准液”的平均值加上两倍的标准差计算分析灵敏度为：0.905 U/ml

## 8.4 精密度（Precision）

### 8.4.1 板内误差（Intra Assay Variation）

样品	例数	平均值（U/ml）	CV（%）
1	20	18.07	3.78
2	20	28.59	5.53

### 8.4.2 板间误差（Inter Assay Variation）

样品	例数	平均值（U/ml）	CV（%）
1	12	19.26	7.86
2	12	29.85	5.20

## 8.5 准确度（Accuracy）

### 8.5.1 质量控制（Quality Control）

按照国家对生化实验室质量管理的有关规定进行质量控制，以确定所测试结果的准确性。并采取适当的统计方法分析数据。如经过对操作程序，所用仪器，试剂有效期，贮存和孵育条件，以及清洗等各个环节确认无误之后仍有可疑的错误结果，请立即联系 DRG 公司或经销商。

### 8.5.2 重现性（Recovery）

在已知浓度的样本中按照 1:1 的比例加入一定浓度的 CA 15-3。理论计算值各取一半未稀释的样品测量值和一半已知浓度的 CA 15-3 数值组成，以实际测量出的浓度所占理论计算浓度的百分比来统计重现性

样本	所加入浓度 1:1(v/v) (U/ml)	实际测量浓度 (U/ml)	理论计算浓度 (U/ml)	回归度 (%)
1	0	19.98		
	25	19.39	22.49	86.2
	50	30.12	34.99	86.1
	100	51.46	59.99	85.8
	200	124.04	109.99	112.8
2	0	35.29		
	25	34.40	30.15	114.1
	50	47.73	42.65	111.9
	100	74.54	67.65	110.2
	200	129.17	117.65	109.8

### 8.5.3 线性度（Linearity）

样本	稀释倍数	平均浓度 (U/ml)	回归度 (%)
1	0	107.04	
	1:2	55.32	103.4
	1:4	28.53	106.6
	1:8	15.23	113.8
	1:16	7.02	105.0
2	0	51.73	
	1:2	28.56	110.4
	1:4	13.14	101.6
	1:8	6.16	95.2
	1:16	3.67	113.5
3	0	33.37	
	1:2	16.24	97.4
	1:4	9.16	109.8
	1:8	4.66	111.8
	1:16	2.31	110.9

## 9. 使用注意事项 (Limitations of use)

### 9.1 对实验结果有影响的物质

任何不当的操作和对程序的微小改变都会影响试验结果。

血红蛋白 (< 4mg/ml)，胆红素 (< 0.5mg/ml)，甘油三脂 (< 30mg/ml)

对实验结果没有影响。

本试剂中含有减少 HAMA 和其他异质抗体影响的物质。然而高浓度的 HAMA 和其他异质抗体仍可影响试验结果。

### 9.2 药品对实验的影响

到目前为止我们还没发现有任何药品对 CA 15-3 的测试有影响。

### 9.3 大剂量拖尾现象 (High-Dose-Hook Effect)

CA 15-3 浓度达到 3000U/ml 时仍未发现大剂量拖尾现象 (High-Dose-Hook Effect)。

## 10. 参考文献

1. Cancer Facts & Figures - American Cancer Society 1992.
2. Parker S, et al.: Cancer Statistics. CA 1996; 65: 5-27.
3. Chittoor S, Swain S: Adjuvant Therapy in Early Breast Cancer. Am Fam Physician 1991;44:453-462.
4. Patterson AGH, Lees AW, Hanson J, et al.: Impact of chemotherapy on survival in breast cancer. Lancet 1980;2:312.
5. Fey MF, Brunner KW, Sonntag RW: Prognostic factors in metastatic breast cancer. Cancer Clin Trials 1981;4:237-247.
6. Hilkens, J., et al.: Monoclonal antibodies against human milkfat globule membranes. Prot. Biol. Fluids 1981;29:813-816.
7. Hilkens, J., et al.: Monoclonal antibodies against human milkfat globule membranes useful in carcinoma research. Prot. Biol. Fluids 1984;31:1013-1016.
8. Hilkens, J., et al.: MAM-6 antigen, a new serum marker for breast cancer monitoring. Cancer Research 1986;46:2582-2587.
9. Hilkens, J., et al.: Monoclonal antibodies against human milkfat globule membranes detecting differentiation antigens of the mammary gland and its tumors. Int. J. Cancer 1984;34:197-206.
10. Kufe, D., et al.: Differential reactivity of a novel monoclonal antibody (DF3) with human malignant versus benign breast tumor. Hybridoma 1984;3(3):223-232.
11. Sekine, H., et al.: Purification and characterization of a high molecular weight glycoprotein detectable in human milk and breast carcinomas. J. Immunol. 1985;135(5):3610-3615.
12. Fujino, N., et al.: Clinical evaluation of an immunoradiometric assay for CA 15-3 antigen associated with human mammary carcinomas: Comparison with carcinoembryonic antigen. Jpn. J. Clin. Oncol. 1986;46:335-345.
13. Colomer, R., et al.: CA 15-3 Early results of a new breast cancer marker. Anticancer Research 1986;6:683-684.
14. Hayes, D.F., et al.: Comparison of circulating CA 15-3 and carcinoembryonic antigen levels in patients with breast cancer. J. Clin. Oncol. 1986;4(10):1542-1550.
15. Pons-Anticet, D.F.M., et al.: Value of CA 15-3 in the follow-up of breast cancer patients. Brit. J. Cancer 1987;55(5):567-569.