

使用说明书

DRG® CA 19-9 癌抗原 ELISA 试剂 (EIA-3940)

1. 简介 (Introduction) :

DRG® CA 19-9 癌抗原标志物酶联免疫吸附试剂 (EIA-3940) 为量化测定血清和血浆内 CA 19-9 的含量提供了工具。该试剂只可作为体外诊断之用。

Lewis 唾液酸抗原通常被认为是癌症相关抗原 CA19-9。DRG® CA 19-9 ELISA 试剂是利用 1116NS19-9 抗体对高分子糖蛋白地反应以测定 CA 19-9。在胰腺-胆道系统的癌症病人中 (也即胰腺, 胆囊和胆道), 通常可发现血清中的 CA 19-9 水平升高。另外, 在一些恶性肿瘤病例中, (如肺癌, 消化道癌症, 和一些非肿瘤疾患), 也有 CA 19-9 水平升高的现象。

特别要注意, 对于 Lewis 血型是阴性基因型的患者中, 即使体内有恶性肿瘤组织, 其血中也不会有 CA 19-9 抗原。

2. 测试原理 (Principle of the test) :

DRG® CA 19-9 肿瘤标志物酶联免疫吸附试剂 (EIA-3940) 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 19-9 分子特异抗原的单克隆抗体。含有内源 CA 19-9 病人样本经稀释后与含有挂着辣根过氧化物酶的抗 CA 19-9 抗体单克隆抗体的酶联物一起在包被有直接抗 CA 19-9 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 19-9 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 19-9 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 19-9 单克隆抗体;
2. 零标准液, 1 小瓶, 3 ml, 即用;
3. 标准液 (Standard) (标准液 1-5) , 共 5 小瓶, 每瓶 0.5 ml, 即用
浓度: 15; 30; 60; 120; 240 U/ml
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. 酶联物 (Enzyme conjugate) , 1 小瓶, 14 ml, 即用, 含有挂着辣根过氧化物酶的抗 CA 19-9 抗体的单克隆抗体, 内含有 0.3%Proclin 保护液
6. 底物液 (Substrate solution) , 1 小瓶, 14 ml, 内含 TMB, 即用;
7. 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;
8. 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, 所需数目的板条及相关仪器在使用前均须平衡至室温。

对照液 (Control) : 以 0.5 ml 蒸馏水溶解对照液小瓶中的冷冻粉, 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 5 天。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，要考虑稀释因子。

下表是一简单的稀释

方法：

1:10 稀释	10 μ l（血清）+ 90 μ l（0 标准液），充分搅匀
1:100 稀释	10 μ l（1:10 稀释后血清）+ 90 μ 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，所有的标准液 (Standards)，样品 (Samples)，和对照液 (Controls) 均要实施平行比照试验，以确保实验条件的一致性。每一轮实验均须制作标准曲线 (Standard Curve)。

1. 将所需数目的板条至于板架上；
2. 依次汲取 10 μ l 标准液 (Standards)，样品 (Samples)，和对照 (Controls) (每一次汲取均要置换一次性塑料加样头)，加样入微孔中；
3. 在每一微孔中加入 100 μ l 酶联物 (Enzyme conjugate)，
4. 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)；
5. 室温下温育 30 分钟 (无需覆盖微孔板)；
6. 快速甩掉微孔内的遗留物，每一微孔加入 400 μ 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；
(本实验的灵敏度和精确度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 μ l 底物液 (Substrate solution)；
8. 室温下温育 30 分钟；
9. 在每个微孔中各加入 100 μ l 反应终止液 (Stop solution) 终止酶反应；
10. 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. 用每一样品的吸光度平均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 19-9 试剂盒所作出标准曲线的典型例子：

标准液	OD 值 (450 nm)
0 标准液 (0 U/ml)	0.06
标准液 1 (15 U/ml)	0.23
标准液 2 (30 U/ml)	0.41
标准液 3 (60 U/ml)	0.69
标准液 4 (120 U/ml)	1.22
标准液 5 (240 U/ml)	2.10

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 19-9ELISA 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	0 U/ml	14.4 U/ml

文献中所发表的 cut-off 值为 37 U/ml

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 – 240 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：0.888 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	59.99	5.71

8.4.2 板间误差 (Inter Assay Variation)

样品	例数	平均值 (U/ml)	CV (%)
1	12	60.52	4.86
2	12	15.92	4.88
3	8	70.93	7.23

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 19-9。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 19-9 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)	重现性 (%)
1	0	54.02		
	30	45.88	42.01	109.2
	60	59.20	57.01	103.8
	120	90.44	87.01	103.9
	240	157.06	147.01	106.8
2	0	17.49		
	30	21.96	23.74	92.5
	60	36.14	38.74	93.3
	120	61.05	68.74	88.8
	240	111.73	128.74	86.8

8.5.3 线性度 (Linearity)

样本	稀释倍数	平均浓度 (U/ml)	重现性 (%)
1	0	57.4	
	1:2	28.27	98.5
	1:4	14.28	99.5
	1:8	7.16	99.7
	1:16	4.04	112.7
2	0	15.95	
	1:2	7.38	92.6
	1:4	4.04	101.4
	1:8	2.26	113.4
	1:16	1.00	100.5
3	0	66.61	
	1:2	30.90	92.8
	1:4	15.92	95.6
	1:8	8.82	105.9
	1:16	4.44	106.5

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 (< 0.125mg/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 19-9 的测试有影响。

9.3 大剂量拖尾现象 (High-Dose-Hook Effect)

CA 19-9 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. Koprowski H, Steplewski Z, Mitchell K, Herlyn M, Herlyn D, Fuhrer P: Colorectal carcinoma antigens detected by hybridoma antibodies. *Somatic Cell Genetics* 5:957-972, 1979.
2. Koprowski H, Herlyn M, Steplewski Z, Sears H: Specific antigen in serum of patients with colon carcinoma. *Science* 212:53-55, 1981.
3. Magnani J, et al.: The Antigen of Tumor-Specific Monoclonal Antibody is a Ganglioside Containing Sialylated Lacto-N-Fucopentaose II. *Federation Proceedings*, 41:898, 1982.
4. Del Villano B, Brennan S, Brock P, Bucher C, Liu V, McClure M, Rake B, Space S, Westrick B, Schoemaker H, Zurawski V Jr: Radioimmunometric Assay for a Monoclonal Antibody-Defined Tumor Marker, CA 19-9. *Clin Chem* 29:549-552, 1983.
5. Steinberg W, Gelfand R, Anderson K, Glenn J, Kurtzman SH, Sindelar W, Toskes P: Comparison of the Sensitivity and Specificity of the CA 19-9 and Carcinoembryonic Antigen Assays in Detecting Cancer of the Pancreas. *Gastroenterology* 90:343-349, 1986.
6. Ritts R Jr, Del Villano B, Go VLW, Herberman R, Klug T, Zurawski V Jr: Initial Clinical Evaluation of an Immunoradiometric Assay for CA 19-9 Using the NCI Serum Bank. *Int J Cancer* 33:339-345, 1984.
7. Safi F, Beger H, Bittner R, Buchler M, Krautzberger W: CA 19-9 and pancreatic adenocarcinoma. *Cancer* 57:779, 1986.
8. NCCLS Guideline EP7-P, entitled "Interference Testing in Clinical Chemistry; Proposed Guideline" August 1986.
9. NCCLS Guideline EP5-A, entitled "Evaluation of Precision Performance of Clinical Chemistry Devices; Approved Guideline," February 1999.
10. Del Villano B and Zurawski V Jr: The carbohydrate antigenic determinant 19-9 (CA 19-9): a monoclonal antibody defined tumor marker. *Immunodiagnosics – Laboratory and Research Methods in Biology and Medicine*, Volume 8. Ed. By J. Hyun and R. Aloisi, Alan R. Liss, New York, pp. 269-282, 1983.