

使用说明书

DRG® CA 72-4 癌抗原 ELISA 试剂 (EIA-3942)

1. 简介 (Introduction) :

DRG® CA 72-4 癌抗原标志物酶联免疫吸附试剂 (EIA-3942) 为量化测定血清和血浆内的 CA 72-4 (TAG-72) 的含量提供了工具。该试剂只可作为体外诊断之用。

CA 72-4 为一 48kD 的糖蛋白。报道表明, 在多种恶性肿瘤疾病中 (包括胰腺癌, 胃癌, 胆囊癌, 直肠癌, 乳腺癌, 卵巢癌, 宫颈癌等) 发现 CA 72-4 的血清和血浆水平均有升高。尽管在一些良性疾患中如风湿病或卵巢囊肿中 CA 72-4 的血清和血浆水平也有升高, 但在消化道和卵巢肿瘤病患中具有诊断意义上的肿瘤标志物作用 (95%可信度)。CA 72-4 在血中的水平与肿瘤的分期和大小有很好的相关性。在对消化道癌病患的治疗效果监测和随访中, CA 72-4 是一个可供选择的检测指标 (其他可供选择的指标还包括 CA19-9 或 CEA)。另外, CA 72-4 也经常被独立用于对卵巢癌病患的治疗效果监测和随访过程中, 特别是对于 CA 125 水平并没有升高的女性病例具有非常意义的肿瘤标志作用。

2. 测试原理 (Principle of the test) :

DRG® CA 72-4 肿瘤标志物酶联免疫吸附试剂 (EIA-3942) 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 72-4 分子特异抗原的单克隆抗体。含有内源 CA 72-4 病人样本经稀释后与含有挂着辣根过氧化物酶的抗 CA 72-4 抗体单克隆抗体的酶联物一起在包被有直接抗 CA 72-4 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 72-4 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 72-4 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 72-4 单克隆抗体；
2. 标准液 (Standard) (标准液 0-4) , 共 5 小瓶, 每瓶 1.0 ml, 即用浓度: 0; 3; 20; 50; 100 U/ml (详见“试剂制备”) 并含有 0.3% Proclin 保护液；
3. 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；
4. 样品稀释液 (Sample diluent) , 1 小瓶, 3 ml, 并含有 0.3%小牛血清保护液, 即用；
5. 酶联物 (Enzyme conjugate) (10 x 浓度) , 1 小瓶, 1.4 ml, 含有挂着辣根过氧化物酶的抗 CA 72-4 抗体的单克隆抗体, (详见“试剂制备”)并含有 0.3%Proclin 保护液；
6. 酶联物稀释液 (Conjugate Diluent) , 1 小瓶, 14 ml, 并含有 0.3%Proclin 保护液, 即用；
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) ;
- 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。

（注：在 2-8°C 条件下保存时，重新使用的标准液和对照液可至少保持 4 个星期的稳定。-20°C 条件下保存可保持更长时间）

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）

酶联物 (Enzyme conjugate) : 用酶联物稀释液以 1:10 的比例稀释酶联物。配置好的酶联物在 2-8°C 并封盖的条件下可稳定一周。

稀释配置举例：

包被板排数	酶联物 (10x 浓度) (μl)	酶联物稀释液 (ml)
1	100	0.9
2	200	1.8
3	300	2.7
4	400	3.6
5	500	4.5
6	600	5.4
7	700	6.3
8	800	7.2
9	900	8.1
10	1000	9.0
11	1100	9.9
12	1200	10.8

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, 肝素或枸橼酸钠抗凝血浆) 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 $2-8^{\circ}\text{C}$ 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, 则样品需要用样品稀释液 (Sample diluent) 进行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 μl (血清) + 90 μl (样品稀释液), 充分搅匀
1:100 稀释	10 μl (1:10 稀释后血清) + 90 μl (样品稀释液), 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 20 μl 标准液 (Standards), 样品 (Samples), 和对照液 (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. 每一微孔中分别加入 100 μl 新鲜配置的酶联物 (Enzyme conjugate) (配置方法见“试剂制备 (Preparation of reagents)”) ;
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 120 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 μl 清洗液 (Wash solution)

清洗，共五次，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 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. 用不同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因子。

下表所列为以 DRG® CA 72-4 试剂盒所作出标准曲线的典型例子：

标准液	光吸收值（450 nm）
标准液 0（0 U/ml）	0.05
标准液 1（3 U/ml）	0.14
标准液 2（20 U/ml）	0.65
标准液 3（50 U/ml）	1.25
标准液 4（100 U/ml）	2.04

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 72-4 ELISA 试剂对正常成年人测试所得到的结果：

测试人群	有效例数	5% - 95%区间	中间值
明显健康人群	55	0 – 33.5 U/ml	0.492 U/ml

此结果很好的吻合了先前文献中所发表的 cut-off 值（<4 – 6 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 – 100 U/ml

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

健康个体血清与 DRG® CA 72-4 ELISA 试剂盒之间无交叉反应。

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： $< 0.311 \text{ U/ml}$

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	9.48	4.54
2	20	22.14	3.34
3	20	65.31	3.84

8.4.2 板间误差 (Inter Assay Variation)

样品	例数	平均值 (U/ml)	CV (%)
1	11	9.99	7.81
2	11	23.65	5.32
3	11	69.80	6.35

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 72-4。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 72-4 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 1:1(v/v) (U/ml)	理论计算浓度 1:1(v/v) (U/ml)	回归度 (%)
1	0.0	13.02	13.02	91.6 105.8 100.2 106.2
	3.0	7.34	8.01	
	20.0	17.48	16.51	
	50.0	31.56	31.51	
	100.0	60.01	56.51	
2	0.0	42.79	42.79	95.2 87.4 92.7 98.5
	3.0	21.79	22.90	
	20.0	27.43	31.40	
	50.0	43.00	46.40	
	100.0	70.34	71.40	
3	0.0	64.72	64.72	86.6 90.1 90.9
	3.0	29.31	33.86	
	20.0	38.15	42.36	
	50.0	52.14	57.36	

	100.0	75.79	82.36	92.0
--	-------	-------	-------	------

8.5.3 线性度 (Linearity)

样本	稀释倍数	平均浓度 (U/ml)	回归度 (%)
1	0	13.02	
	1:2	6.39	98.2
	1:4	2.83	87.0
	1:8	1.47	90.2
	1:16	0.80	98.2
2	0	42.79	
	1:2	22.64	105.8
	1:4	10.30	96.3
	1:8	4.75	88.8
	1:16	2.58	96.3
3	0	64.72	
	1:2	33.82	104.5
	1:4	18.25	112.8
	1:8	8.32	102.9
	1:16	4.51	111.6

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 72-4 的测试有影响。

9.3 大剂量拖尾现象 (High-Dose-Hook Effect)

CA 72-4 浓度达到 6500U/ml 时仍未发现大剂量拖尾现象 (High-Dose-Hook Effect)。

10. 参考文献

1. Colcher D., Horand Hand P., Nuti M., Schlom J. A spectrum of monoclonal antibodies reactive with human mammary tumor cells. Proc. Natl. Acad. Sci. 1981, 78:3199-3208
2. Johnson VG, Schlom J., Paterson AJ, Bennett J, Magnani JL, Colcher D. Analysis of a human tumor associated glycoprotein (TAG-72) identified by monoclonal antibody 72.3. Cancer Res. 1986; 46: 850-857
3. Lamerz R. in Thomas L. (editor) Labor und Diagnose 5. edition, TH-Books Verlagsgesellschaft mbH, Frankfurt/Main 1998, 973-976
4. Guadagni F, Roselli M, Cosimelli M, Ferroni P, Spila A, Cavaliere F, Casaldi V, Wappner G, Abbolito MR, Greiner JW, et al. CA 72-4 serum marker – a new tool in the management of carcinoma patients. Cancer Invest. 1995; 13(2): 227 – 238.
5. Hasholzner U, Baumgartner L, Stieber P, Meier W, Hofmann K, Fateh-Moghadam A. Significance of the tumour markers CA 125 II, CA 72-4, CASA and CYFRA 21-1 in ovarian carcinoma. Anticancer Res. 1994 Nov-Dec;14 (6B):2743-6.