

# 使用说明书

## ***DRG® CYFRA 21-1 ELISA 试剂*** ***(EIA-3943)***

### **1. 简介 (Introduction) :**

DRG® CYFRA 21-1 肿瘤标志物酶联免疫吸附试剂 (EIA-3943) 为量化测定血清和肝素化血浆内的 CYFRA 21-1 的含量提供了工具。该试剂只可作为体外诊断之用。

CYFRA 21-1 是细胞角蛋白 19 的一个片断。尽管在身体各个细胞内均由表达，但在肺组织中的表达尤其突出，特别是肺癌组织中。CYFRA 21-1 作为肿瘤标志物在诊断中的重要性主要表现在对非小细胞肺癌 (NSCLC) 病人的鉴别诊断，预后及术后评价。另外也有报道作为肿瘤标志物的 CYFRA 21-1 亦可用于对膀胱癌的监测。

DRG® CYFRA 21-1 肿瘤标志物酶联免疫试剂 (EIA-3943) 使用的是 KS19.1 和 BM19.21 双鼠单克隆抗体，以确定细胞角蛋白 19 片断。

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

DRG® CYFRA 21-1 肿瘤标志物酶联免疫吸附试剂 (EIA-3943) 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 CYFRA 21-1 分子特异抗原的单克隆抗体。含有内源 CYFRA 21-1 病人样本经稀释后与含有挂着辣根过氧化物酶的抗 CYFRA 21-1 抗体单克隆抗体的酶联物一起在包被有直接抗 CYFRA 21-1 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 CYFRA 21-1 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 CYFRA 21-1 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 CYFRA 21-1 单克隆抗体;
2. 标准液 (Standard) (标准液 0-4), 共 5 小瓶 (冷冻粉), 每瓶 1.0 ml 浓度: 0; 3; 10; 25; 50ng/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), 1.0 ml (详见“试剂制备”) 并含有 0.3%Porclin 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) (21 x 浓度), 1 小瓶, 0.5 ml, 含有挂着辣根过氧化物酶的抗 CYFRA 21-1 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, 7 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。

**标准液 (Standards) :** 以 1 ml 蒸馏水溶解标准液小瓶中的冷冻粉。

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

**对照液 (Control) :** 以 1 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：在 2-8°C 条件下保存时，重新使用的对照液可至少保持 4 个星期的稳定。 -20°C 条件下保存可保持更长时间）

间)  
子

**清洗液 (Wash solution) :** 取 30 ml 高浓度清洗液加入 1170 ml 去离

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 1:21 的比例稀释酶联物。配置好的酶联物需要在 24 小时之内使用。使用时可参考下表数据配置酶联物。

稀释配置举例：

包被板排数	酶联物 (21x 浓度) (μl)	酶联物稀释液 (ml)
1	25	0.5
2	50	1.0
3	75	1.5
4	100	2.0
5	125	2.5
6	150	3.0
7	175	3.5
8	200	4.0
9	225	4.5
10	250	5.0
11	275	5.5
12	300	6.0

#### 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，要放在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)

血清或肝素化的血浆样品可用于本试剂盒的检测。

枸橼酸钠抗凝血浆可以降低试验的结果，而 EDTA 则可升高试验结果。

不要使用已溶血的，黄疸和脂血样品。

### 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 2 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 $\mu$ l (血清) + 90 $\mu$ l (样品稀释液)，充分搅匀
1:100 稀释	10 $\mu$ l (1:10 稀释后血清) + 90 $\mu$ l (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，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 50  $\mu$ l 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 50  $\mu$ l 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 30 分钟 (无需覆盖微孔板);
6. 快速甩掉微孔内的遗留物, 每一微孔用 350 $\mu$ l 清洗液 (Wash solution) 清洗, 共三次, 而后在吸水纸巾 (Absorbent paper) 用力拍打微孔板条/, 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 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 $\mu$ 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® CYFRA 21-1 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 ng/ml)	0.05
标准液 1 (3 ng/ml)	0.23
标准液 2 (10 ng/ml)	0.63
标准液 3 (25 ng/ml)	1.37
标准液 4 (50 ng/ml)	2.35

## 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 CYRFRA21-1 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%区间	95%区间
正常男性和女性	71	0.37 ng/ml	2.82 ng/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 – 50 ng/ml

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

健康个体血清与 DRG® CYRFRA21-1 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：< 0.266 ng/ml

8.4 精密度（Precision）

8.4.1 板内误差（Intra Assay Variation）

样品	例数	平均值 (ng/ml)	CV (%)
1	20	5.64	1.9
2	20	7.33	1.9
3	20	23.21	2.3

8.4.2 板间误差（Inter Assay Variation）

样品	例数	平均值 (ng/ml)	CV (%)
1	11	5.54	7.6
2	11	8.01	4.8
3	11	13.93	7.4

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加入一定浓度的 CYFRA21-1，以实际测量出的浓度所占理论计算浓度的百分比来统计回归度

样本	所加入浓度 (ng/ml)	实际测量浓度 (ng/ml)	理论计算浓度 (ng/ml)	回归度 (%)
1	0.0	5.33		
	2.0	6.95	7.33	94.8
	4.0	9.20	9.33	98.6
	8.0	12.89	13.33	96.7
	16.0	21.27	21.33	99.7
2	0.0	7.75		
	2.0	9.79	9.75	100.4
	4.0	11.89	11.75	101.2
	8.0	14.75	15.75	93.7
	16.0	23.15	23.75	97.5
3	0.0	13.39		
	2.0	14.91	15.39	96.9

	4.0	17.05	17.39	98.0
	8.0	19.57	21.39	91.5
	16.0	28.51	29.39	97.0

### 8.5.3 线性度 (Linearity)

样本	稀释倍数	实际测量浓度 (ng/ml)	理论计算浓度 (ng/ml)	回归度 (%)
1	0	9.06	9.06	
	1:2	4.61	4.53	101.9
	1:4	2.21	2.27	97.6
	1:8	1.11	1.13	98.0
	1:16	0.52	0.57	91.8
2	0	15.33	15.33	
	1:2	7.56	7.67	98.6
	1:4	3.78	3.83	98.6
	1:8	1.71	1.92	89.2
	1:16	0.86	0.96	89.8
3	0	30.48	30.48	
	1:2	15.49	15.24	101.6
	1:4	7.15	7.62	93.8
	1:8	3.52	3.81	92.4
	1:16	1.82	1.91	95.6

## 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 CYFRA21-1 的测试有影响。

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

CYFRA21-1 浓度达到 400ng/ml 时仍未发现大剂量拖尾现象 (High-Dose-Hook Effect)。

## 10. 参考文献

1. Petra Stieber CYFRA 21-1 (Cytokeratin-19-Fragment) in Lothar Thomas, Labor and Diagnose, TH Books, Frankfurt, Germany.

2. J-L Pujol, O Molinier, W Ebert, J-P Daures, F Barlesi, G Bucceri, M Paesmans, E Quoix, D Moro-Sibilot, M Szturmowicz, J-M Brechet, T Muley and J Grenier (2004) *British Journal of Cancer* 90(11):2097-2105.