

甲状腺球蛋白高灵敏度 ELISA 检测试剂盒使用说明书

预期用途

RSR Tg ELISA 仅用于定量检测人血清中甲状腺球蛋白 (Tg)，需专业人员操作使用。检测血清 Tg 水平对甲状腺癌治疗管理尤其是初次治疗后具有重要意义。应特别注意的是，检出血清 Tg 水平的升高是早期诊断持续性或复发性疾病的可靠指标。

参考文献

G. Wunderlich et al

A high sensitivity enzyme-linked immunosorbent assay for serum thyroglobulin.

Thyroid 2001 11: 819-824

K. Zöphel et al

Serum thyroglobulin measurements with a high sensitivity enzyme-linked immunosorbent assay: Is there a clinical benefit in patients with differentiated thyroid carcinoma?

Thyroid 2003 9: 861-865

M. Castagna et al

The use of ultrasensitive thyroglobulin assays reduces but does not abolish the need for TSH stimulation in patients with differentiated thyroid carcinoma.

J Endocrinol Invest 2011 34: 219-223

检测原理

RSR Tg ELISA 采用双抗体夹心法原理，利用包被在微孔板上的高亲和力 Tg 抗体捕获待检血清中的 Tg，然后通过加入与辣根过氧化物酶结合的第二种 Tg 抗体检测所获取的 Tg。该方法检测灵敏度极高，检测范围为 0.03 至 1000ng/mL。调节样本稀释度可改变 Tg ELISA 灵敏度和检测范围。当每孔加样量为 25 μ L，我们建议采用以下做法：(a) 对于一般筛查，采用 1:100 的稀释度，检测范围为 3-1000 ng/mL；(b) 未稀释血清样品检测范围则为 0.013-10 ng/mL。405nm 和 450nm 下读板，标准曲线数据参见第 3 页。

血清样本的贮存和制备

待检的血清分离后应立即检测，或在不低于-20°C的条件下贮存（建议分装储存）。每样需 50 μ l 血清（25 μ l/孔，进行复孔检测）。切忌反复冻融或提高贮存温度。切勿使用脂血或溶血样本。检测时禁止使用血浆。需要时可在室温下解冻待检血清，轻轻混匀确保均匀性。检测前对血清作离心处理（建议使用微型离心机在10-15000g离心5分钟）。若血清浑浊或含微粒物质，必须进行离心处理。确定每个待检血清样本稀释度（见上文），用试剂盒中提供的样本稀释液对样本和试剂盒对照品进行适当稀释。切勿稀释试剂盒标准品、阴性对照以及回收样本。在同一检测中可使用同一条（未稀释）标准曲线检测不同稀释度的不同测试血清。如果待检测的是未稀释的血清，则必须包含另一条标准曲线，在该曲线的每个微孔加入25 μ L的人抗鼠抗体（HAMA）阻断剂。

IFU符号

符号	含义
	欧洲委员会符合性说明书
	体外诊断试剂
	产品样本号，目录编号
	批号
	参阅使用说明
	生产商
	充足
	有效日期
	贮存
	阳性对照
	阴性对照

未提供的必需材料

能调节25 μ L、100 μ L和200 μ L的移液器。

能够按量配给多种体积以复溶或稀释试剂的方法。

纯水。

酶标仪，适用于96孔形式，能在450nm和405nm波长条件下进行检测。

振荡器，每分钟可振荡500次（非定轨振荡器）。

微孔板盖。

试剂盒组成

将未打开的试剂盒及其所有组份2-8 $^{\circ}$ C保存。

A	TgAb包被微孔板 每个检测板中设12个板条，每条8孔（共96孔），密封保存于箔袋中。箔袋开封前在室温条件下静置。
	微孔条需与所提供的底架牢固结合。开封后未使用的任何微孔条均应放回原先的箔袋，并以胶带密封。将箔袋置于装有干燥剂的自封式塑料袋中，2-8 $^{\circ}$ C温度条件下最多贮存12周。
B1-8	标准品 0.03、0.05、0.1、0.3、1、2、3和10ng/mL 8小瓶 冻干粉
	每瓶标准品在使用前以1.0mL纯水复溶。在2-8 $^{\circ}$ C温度条件下最多贮存12周。
C	阴性对照品 1 x 1.0 mL 直接使用
D1-2	阳性对照品I和II（浓度范围详见标签） 2小瓶 冻干粉
	每瓶对照品在使用前以1.0mL纯水复溶。在2-8 $^{\circ}$ C温度条件下最多贮存12周。检测之前用样本稀释液（G）按100倍稀释。
E	回收物 1小瓶 冻干粉
	每瓶回收物在使用前以1.5mL纯水复溶。在2-8 $^{\circ}$ C温度条件下最多贮存12周。
F	HAMA阻断剂

	1 x 4 mL 直接使用（仅在检测未稀释血清样本时需要）
G	样本稀释液 1 x 100 mL 直接使用 （含HAMA阻断剂）
H	结合物复溶液 1 x 25 mL 直接使用
I	结合物 1小瓶 冻干粉 用20mL的结合物稀释液（H）复溶。在2-8℃温度条件下最多贮存12周。
J	过氧化物酶底物（TMB） 1 x 12 mL 直接使用
K	终止液（0.5M H₂SO₄） 1 x 12 mL 直接使用
L	浓缩洗涤液 1 x 125 mL 使用前用纯水进行10倍稀释。在2-8℃温度条件下最多贮存12周。

使用HAMA阻断剂（F）

样本稀释液（G）所含的鼠免疫球蛋白G（IgG）可阻断待检血清中可能存在的任何HAMA，但若待检血清未稀释，在加入未稀释的待检血清或试剂盒校准物和对照品之前应向每个微孔中加入25μL试剂盒自带的HAMA阻断剂（F）。检测稀释血清时无需加入25μL的HAMA阻断剂 [稀释液（G）中含有阻断剂]。

实验步骤

所有试剂使用前至少应在室温（20-25℃）下放置30分钟。第1、5、7、8步建议使用Eppendorf连续移液器。

1. 如果使用未稀释的样本时，每孔加入25μL的HAMA阻断剂（F），设置一个空白孔（详见第9步）。
2. 在相应的微孔中加入25μL标准品（B1-8）、阴性对照品（C）、经稀释的阳性对照品（D1-2）和患者血清（复孔），一个微孔留做空白（详见第9步）。
3. 盖上微孔板盖，在ELISA板振荡器（500次/分）上室温（20-25℃）孵育2小时。
4. 孵育完成后，用洗板机吸取洗涤液，或将条孔框架快速倒置在一个适当的容器上来清除洗涤液。用稀释的洗涤液（L）洗涤各孔三次（每孔约250μL），在清洁干燥的吸收性表面上轻拍倒置的微孔，除去多余的洗涤液（自动洗板机可省略该步）。
5. 用移液器向各微孔（空白孔除外）加入200μL复溶的结合物（I），盖上微孔板盖后室温（20-25℃）孵育17-21小时。
6. 重复洗涤步骤4。
7. 用移液器向各微孔（包括空白孔）加入100μL过氧化物酶底物（J），无振荡室温（20-25℃）避光孵育15分钟。
8. 用移液器向各微孔（包括空白孔）加入100μL终止液（K），将孔板在振荡器上振荡5秒钟左右。确保各孔底物孵育时间一致。
9. 使用ELISA板酶标仪在405nm和450nm波长条件下分别读取各孔吸光度，空白对照孔仅含100μL过氧化物酶底物（J）和100μL终止液（K）。

TgAb干扰和回收试验

待检血清中存在的Tg自身抗体会干扰Tg检测，包括RSR公司的Tg ELISA。尽管如此，若酶联免疫吸附检测前将血清稀释10-100倍，此种干扰可降至最低水平，因为自身抗体浓度在稀释时会大大降低。回收试验评估表明，检测未稀释血清时，Tg自身抗体干扰更加频繁，因此，开展此类检测时特别建议进行回收试验。

回收试验程序

1	用1.5mL样本稀释液（G）稀释复溶的回收物（E），制成约含2.5ng/mL Tg的制剂。
2	向50μL的样本（纯样本或稀释样本）内加入50μL的上述回收物（2.5ng/mL Tg），混匀。
3	依照检测程序检测25μL的样本（纯样本或稀释样本）（x）、样本与回收物混合物（y）和回收物（z）。
4	回收率计算： 设x=样本浓度，y=样本与回收物质混合物浓度，z=回收物浓度，则： $\% \text{ Recovery} = \frac{y}{(z + x)/2} \times 100$
5	可接受的回收率范围=60-130%

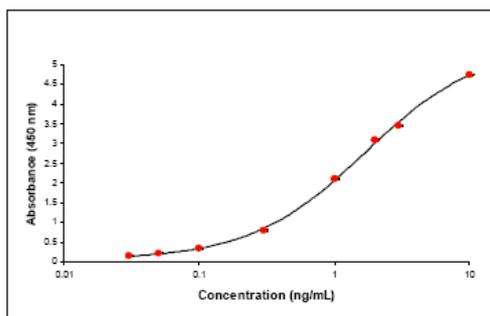
结果分析

绘制标准曲线，X轴为浓度（对数模式），Y轴为吸光度（线形模式）。利用校准曲线读取待检血清和试剂盒阳性对照品中的Tg浓度，然后根据样本稀释倍数调节样本最终Tg浓度。RSR标准曲线为4参数曲线。还可使用其他数据处理系统。阴性对照品可设为0.0001ng/mL以辅助检测结果的计算机处理。405nm波长下读板时可检测下表所示的有较高吸光度样本。较低的吸光度应从450nm标准曲线读取。

举例（仅作示例，不用于实际结果计算）

标准品 ng/mL	室温过夜孵育后在405nm和450nm 波长条件下的吸光度*	
	405 nm	450 nm
阴性对照品	0.025	0.084
0.03	0.042	0.152
0.05	0.063	0.210
0.1	0.103	0.351
0.3	0.233	0.797
1	0.616	2.097
2	0.910	3.085
3	1.040	3.460
10	1.440	4.752

* 所示吸光度数值已减除空白值（405nm对应0.053；450nm对应0.049）。



性能评价

正常值

420名甲状腺自身抗体呈阴性的健康志愿者（女性占36%）检测结果显示，Tg水平为1.5-590ng/mL（平均±SD = 33±44；中位数= 23）。

临床准确性

Tg ELISA检测过程中，乙酰胆碱受体抗体、促甲状腺激素受体抗体、21-OH抗体、类风湿因子和双股脱氧核糖核酸抗体阳性血清对其实验结果均未造成任何干扰。

检测下限

将试剂盒阴性对照样本检测20次，计算出平均值和标准差。2个标准差条件下的检测下限值为0.015ng/mL。

功能性灵敏度

功能性灵敏度为0.016ng/mL（当试剂盒阴性对照赋值为0.0001ng/mL）。

批间精密度

	样本 A (1:10)	样本 B (1:10)	样本C (未稀释)	样本D (未稀释)
n	20	20	20	20
[Tg] ng/mL	0.96	2.58	0.40	1.46
CV%	4.7	4.1	9.5	6.2

批内精密度

样本	样本E (未稀释)	样本F (1:10)
样本数量	21	21
[Tg] ng/mL	0.39	1.21
CV%	5.9	4.6

校准

RSR Tg ELISA依照人Tg标准CRM 457（标准物质局，布鲁塞尔）使用RSR Tg免疫放射检测法（IRMA）进行校准。

高剂量钩状效应

甲状腺球蛋白浓度低于100ug/mL时未观察到高剂量钩状效应。

干扰性

当待测样本混有以下物质时，对检测结果并无干扰：5mg/mL以下的血红素；20mg/dL以下的胆红素以及30mg/mL以下的脂肪乳剂。

本说明书中引用的数据仅供参考。我们推荐每个实验室在检测中建立自己的质控样本模式，同时还应设定自己的Tg水平正常范围。

安全性

遵照说明书仔细操作。注意标签上注明的有效期和复溶及稀释试剂稳定性。详细的安全信息参见材料安全数据清单。用于本试剂盒中的人源性材料与HIV1, HIV2, HCV抗体, 及HBsAg并无反应, 且已得到验证。但我们在处理这些潜在的感染也应多加注意。如果存在污染, 我们在离开实验室之前应彻底的洗手。潜在的污染废物包括样本在内, 在处理之前应进行灭菌。本试剂盒涉及的非人源性的材料(如来自动物)已经证实均来自健康的动物, 但这些物质我们也按潜在的感染源进行处理。试剂盒中有一些组分包括少量叠氮化钠作为防腐剂。试剂盒中的所有组分避免食入, 吸入, 注射和直接接触到皮肤、眼睛、衣服。在处理试剂盒组分时, 要用大量的水冲洗排水系统, 避免形成重金属复合物。

简单操作步骤

所有试剂和样本在使用前均应达到室温 (20-25°C)	
加样:	仅限于未稀释的血清, 各微孔 (空白孔除外) 内加入25 μ L的HAMA阻断剂 (F)
加样:	25 μ L标准品、对照品和患者血清 (空白孔除外)
孵育:	室温振荡2小时
吸出/倒出:	微孔板
洗涤:	洗板三次 (手动洗涤时在吸水性材料上拍干)
加样:	各微孔 (空白孔除外) 加入200 μ L结合物 (I)
孵育:	无须振荡室温过夜孵育 (17-21小时)
吸出/倒出:	微孔板
洗涤:	洗板三次 (手动洗涤时在吸水性材料上拍干)
加样:	各微孔 (包括空白孔) 加入100 μ L过氧化物酶底物 (J)
孵育:	室温避光孵育15分钟
加样:	各微孔 (包括空白孔) 加入100 μ L终止液 (K), 振荡5秒钟
加入终止液后15分钟内, 450nm和405nm条件下的读取吸光度	