

TSH 受体自身抗体 2 代 ELISA 检测试剂盒使用说明书

预期用途

TSH 受体自身抗体 2 代 ELISA 检测试剂盒仅用于人血清中抗 TSH 受体自身抗体的体外定量检测，需专业技术人员操作。Graves'病表现的甲状腺机能亢进是由于 TSH 受体抗体的存在，因此检测 TSH 受体抗体（TRAb）对该病的诊断和治疗，具有重要的意义。

参考文献

J. Bolton et al

Measurement of thyroid stimulating hormone receptor autoantibodies by ELISA

Clin. Chem. 1999 45: 2285-2287

K. Kamijo

TSH receptor antibody measurement in patients with various thyrotoxicosis and Hashimoto ' s thyroiditis: a comparison of two two-step assays, coated plate ELISA using porcine TSH receptor and coated tube radioassay using human recombinant TSH receptor

Endocrine Journal 2003 50:113-116

B. Rees Smith et al

A new assay for thyrotropin receptor autoantibodies

Thyroid 2004 14: 830-835

专利

受欧洲专利 EP 1021721 B1，美国专利 US 6,844,162 B1，日本专利 4331403 的保护

检测原理

在 RSR 的 TRAb ELISA 检测方法中，患者血清，标准品和质控品中的 TRAb，可以经 2 小时孵育和微孔板上包被的 TSH 受体充分结合，弃去反应液，然后加入生物素标记的 TSH，它与未同 TRAb 结合的包被的 TSH 受体结合，未结合的 TSH-生物素通过洗板被弃去，结合的 TSH-生物素的数量是由第三步中加入的链亲和素-过氧化物酶的量决定的，它与生物素特异性的结合。弃去未结合的链亲和素-过氧化物酶，加入 TMB，形成蓝色复合物。加入终止剂终止反应，微孔板由蓝色变为黄色，在波长 450nm 读取吸光度。当吸光度较低时，表示待检样本中的 TRAb 与微孔板上包被的 TSH 受体结合量较多，抑制了 TSH-生物素与微孔板中的 TSH 受体的结合。检测范围是 1-40u/L(NIBSC 08/204)

样本要求及储存

待检标本应立即分离出血清进行检测，或-20℃ 分装保存

每份样本需要 150ul 血清（每孔 75ul，实验建议进行复孔）

尽量避免反复冻融，防止储存温度过高

不正确储存方式会引起 TRAb 活性降低。

避免使用脂血、溶血的样本，不宜使用血浆进行检测。

需要时，在室温下(20-25摄氏度)解冻测试血清并轻轻混匀。当血清含有絮状物或者颗粒时，需要离心以去除颗粒物质（推荐速度：10000-15000rpm，离心 5 分钟），请勿省略离心处理步骤

实验设备

能调剂 50ul, 75ul 和 100ul 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（波长 450nm）
ELISA 板振荡器（500shake/min 以上，非垂直振荡器）
ELISA 微孔板盖 IFU 符号

符号

符号	含义
	欧盟委员会符合性说明书
	体外诊断医疗器械
	产品样本号、目录编号
	批号
	参阅使用说明
	生产商
	有效日期
	贮存
	阳性质控品
	阴性质控品

试剂盒组成

A	TSH 受体包被的微孔板，每个框架中设 12 个分隔条，每条 8 孔（共 96 孔），密封保存于箔袋中。开封前提前室温（20-25℃）放置 30 分钟
	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，有效期内 2-8oC 保存。
B	初始缓冲液 10ml， 开瓶即用

C1-C4	标准品 浓度分别为 1, 2, 8 和 40u/L（单位为 NIBSC 08/204），4 x 1.0mL 开瓶即用
D1	阴性对照， 1.0ml 开瓶即用
D2	阳性对照，（浓度详见标签） 1.0ml 开瓶即用
E	TSH-生物素 3 小瓶， 冻干粉， 每只 TSH-生物素需要用 4.5ml 的复溶缓冲液复溶（F），当使用多只时，将其合在一起充分混匀使用。复溶后在试剂盒有效期内 2-8oC 保存
F	TSH-生物素的复溶缓冲液 15ml 开瓶即用
G	链霉亲和素-过氧化物酶(SA-POD) 0.75ml 浓缩型 用 SA-POD 稀释液进行 20 倍稀释（H）.例如，0.5ml（G）+9.5ml（H） 试剂盒有效期内 2-8oC 保存
H	SA-POD 稀释液 15ml 开瓶即用
I	过氧化物酶底物（四甲基联苯胺 TMB） 15ml 开瓶即用
J	浓缩洗涤液 100ml 浓缩型 用之前用纯水稀释至 1L,试剂盒有效期内 2-8oC 保存
K	终止液 10mL 开瓶即用

实验步骤

所有的试剂及待检样本在检测前需在室温下（20-25oC）放置至少 30 分钟;在步骤 1,5,8,10 和 11 中建议使用 Eppendorf 移液器；强烈建议待检样本，标准品和对照均做复孔。

1. 每孔加入 75ul 初始缓冲液（B）,最后一孔作为空白孔（见步骤 12）。
2. 在相应的孔中加入 75ul 的患者血清，标准品(C1-C4)和对照（D1-D2）。加样顺序建议是

- 先加标准品（高浓度到低浓度），随后是阴性对照和待检血清，最后一个孔位空白。
3. 盖上微孔板盖，将微孔板至于 ELISA 板振荡器，室温放置 2 小时（500 次/分）
 4. 用洗板机抽出试剂，并用稀释好的洗液(J)，在洗板机上进行一次洗板。若未配备洗板机，可将微孔板框架在适当的容器上快速翻转，以去除孔内物质，然后手洗一次，再将倒置的孔板在清洁的吸水纸上轻轻拍打，从而清除残余的洗涤剂。
 5. 除去空白孔，其余各孔加入复溶的 TSH-生物素（E）100ul。加样过程中防止液体的溅出。
 6. 盖好微孔板，室温放置 25 分钟，无需振荡。
 7. 重复步骤 4，
 8. 除去空白孔，每孔中加入 100ul 稀释的链霉亲和素-过氧化物酶(G)，盖好微孔板，室温放置 20 分钟，无需振荡
 9. 用洗板机抽出试剂，并用稀释好的洗液(J)，在洗板机上进行三次洗板。若未配备洗板机，可将微孔板框架在适当的容器上快速翻转，以去除孔内物质，然后用稀释好的洗液手洗 2 次，纯水洗 1 次，再将倒置的孔板在清洁的吸水纸上轻轻拍打，从而清除残余的洗涤剂。
 10. 每孔中加入 100ulTMB(I)，避光室温放置 30 分钟，无需振荡
 11. 每孔中加入 50ul 终止液（K），盖好微孔板，在振荡器上振荡约 5 秒钟。确保每孔的底物孵育时间相同。
 12. 用酶标仪在波长 450nm 下读取每孔的吸光度 OD 值，空白孔中仅包含 100ul TMB(I)和 50ul 终止液(K)。

结果分析

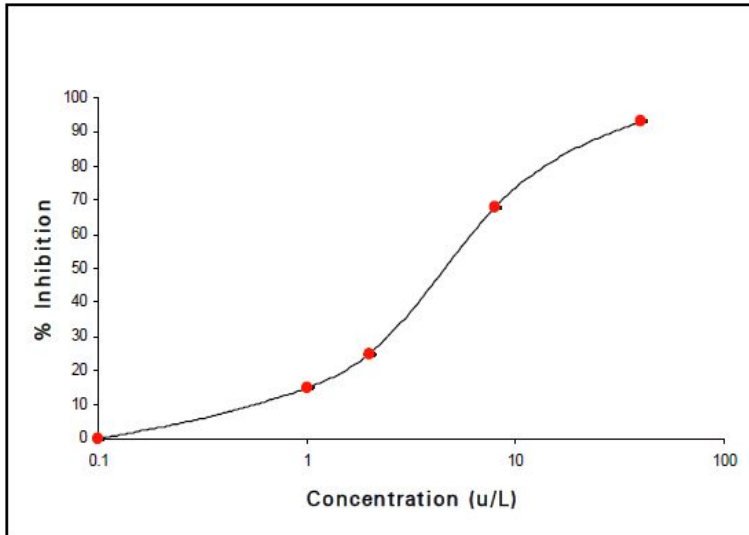
绘制标准曲线，X 轴为浓度（对数模式），Y 轴为 OD（线形模式）。患者血清中的 TRAb 浓度可以从标准曲线中读出（RSR 绘制对数/线性样条曲线，曲线平滑系数=0）。阴性质控品在计算机处理数据时可指定为0.1u/L。可采用其他拟合方式。结果也可以用 TSH 结合的抑制率来表示，如下公式：

$$100 \times (1 - \text{样本在 } 450\text{nm 的吸光度} / \text{阴性对照 (D1) 在 } 450\text{nm 的吸光度})$$

当样本中 TRAb 浓度过高时，可以用阴性对照（D1）来稀释。例如 20ul 样本+180ul 阴性对照，相当于 10 倍稀释。其他稀释样品（例如 100 倍）可以从 10 倍稀释液制备或视情况而定。一些血清的稀释不会呈线性，我们建议取抑制率为 50%左右时的稀释倍数来计算 TRAb 浓度。

举例（仅作参考，不用于实际结果计算）

Sample	A450（减去空白）	%I	u/L
阴性对照	2.00	0	0
标准品 1	1.70	15	1
标准品 2	1.50	25	2
标准品 3	0.65	68	8
标准品 4	0.15	93	40
阳性对照	1.26	37	3.5



检测临界值

	单位 (u/L)
阴性	1 u/L
疑似	1.1 - 1.5 u/L
阳性	>1.5 u/L

本说明书中制定的临界值在RSR完成。我们推荐每个实验室在检测中建立自己的质控样本模式，同时也应该建立自己的 TRAb 的正常值和病理学上有参考意义的检测范围

临床特异性

用本试剂盒对 154 名健康志愿者的血清进行检测，其中 152 名的 TSH 受体抗体检测结果为阴性（99%）

临床灵敏度

用本试剂盒对 50 名诊断为 Graves'病的患者血清样本进行检测，49 例 TSH 受体抗体为阳性（98%）。1 例（2%）TSH 受体抗体为疑似。

功能性

灵敏度

当批间精密度为 20%， 灵敏度为 0.60u/L.

检测下限

将本试剂盒的阴性对照检测 320 次，计算出平均值和标准差，2 个标准差条件下的检测下限为 0.21u/L。

批间精密度

样品	u/L (n=20)	CV (%)
1	3.9	12.9
2	5.4	10.9

批内精密度

样品	u/L (n=25)	CV (%)
1	1.8	7.1
2	7.8	2.2

临床准确性

用本试剂盒对非 Graves'病的自身免疫疾病患者血清进行检测，结果显示自身抗体对甲状腺球蛋白，甲状腺过氧化物酶，谷氨酸脱酸酶，21-羟化酶，乙酰胆碱，双链 DNA 及类风湿因子对本实验结果无影响，无干扰。

干扰性

当待检样本中混有以下物质时，对检测结果并无干扰：血色素 5mg/mL，胆红素 0.2mg/mL，脂肪乳剂 30mg/mL 以下，促黄体生成素 10u/mL 以下，绒毛膜促性腺激素 160u/mL 以下，卵泡刺激素 70u/mL 以下，及促甲状腺素 3u/L 以下。

安全性

本试剂盒用于体外检测，需由专业技术人员根据说明书进行操作。请关注标签上注明的有效期和组份的稳定性包括包被微孔板及稀释或复溶试剂。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，且已经得到验证，但在处理这些潜在的感染也应该多注意。如果存在污染，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，但这些物质仍应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

安全提示：

链霉亲和素-过氧化物酶(SA-POD)：

提示符：警告 

危害信息：可能引起皮肤过敏反应

应对方式：

P280：穿戴个人防护设备：手套、衣物、眼部/面部防护

P302+P502：皮肤沾染后使用大量清水和肥皂冲洗

P333+P313：若损害已经发生，请立即就医

P362+P364：脱掉沾染的衣物，在重新使用前洗净

初始缓冲液&浓缩洗涤液：

提示符：警告 

危害信息：引起严重的眼部刺激

应对方式：

P280：穿戴个人防护设备：手套、衣物、眼部/面部防护

P305+P351+P338：若眼部沾染，使用水小心冲洗眼部几分钟。若佩戴角膜接触镜请小心取下后持续用水清洗。

P337+P313：若刺激症状仍未解除，请及时就医

过氧化物酶底物(TMB):

提示符: 危险 

危害信息: 胎儿毒性

应对方式:

P280: 穿戴个人防护设备: 手套、衣物、眼部/面部防护

P308+P313: 若暴露已发生或疑似发生, 请及时就医

简要操作步骤

所有试剂和样本在使用前均应达到室温 (20-25℃)	
加样:	每孔加75ul 初始缓冲液 (除去空白孔)
加样:	每孔加 75ul 标准品 (加样顺序由高浓度到低浓度)、对照和患者血清 (除去空白孔)
孵育:	ELISA 板振荡器上室温孵育2 小时 (500 次/分)
弃去反应液:	微孔板
洗涤:	洗板一次 (如手工洗版, 洗板后应倒置在吸水纸上拍干)
加样:	每孔中加入100ul TSH-生物素 (复溶的) (除去空白孔)
孵育:	室温放置25 分钟, 无需振荡
弃去反应液:	微孔板
洗涤:	同上
加样:	每孔加入100ulSA-POD(1:20 稀释) (除去空白孔)
孵育:	室温放置20 分钟, 无需振荡
弃去反应液:	微孔板
洗涤:	洗板 3 次 (如手工洗版, 则用稀释好的洗液洗 2 次, 纯水洗 1 次, 洗板后应倒置在吸水纸上拍干)
加样:	每孔加入100ulTMB(包括空白孔)
孵育:	避光室温放置30 分钟, 无需振荡
加样:	每孔加入50ul 终止液 (包括空白孔), 振荡5 秒钟
450nm下读取吸光度	
不要在室温25℃以上进行该试验	