

# 人全段甲状旁腺激素检测试剂盒（酶联免疫法）说明书

货号：7022

## 【产品名称】

通用名称：人全段甲状旁腺激素检测试剂盒  
（酶联免疫法）

英文名称：Intact PTH ELISA

## 【包装规格】

96 人份/盒

## 【预期用途】

本试剂盒用于体外定量检测人血清中全段甲状旁腺激素（I-PTH）的水平。适用于体外诊断。

## 概述

甲状旁腺激素（PTH）的生成过程：先是在甲状旁腺内生成一个含有 115 个氨基酸残基的较大分子——前甲状旁腺激素原，经细胞内裂解脱掉 25 肽后，生成 90 肽的甲状旁腺激素原（pro-PTH），再经水解作用脱去 6 个氨基酸，转变成 84 肽 PTH。在健康人体内，PTH 的调节通常是通过血钙水平对甲状旁腺的负反馈完成的。完整的 PTH 具有生物活性，但在循环系统中的清除速率非常快，半衰期不足 4 分钟<sup>1</sup>。虽然 PTH 在甲状旁腺中即开始水解，但其水解过程主要是在肝、肾和骨内进行。PTH 经水解产生 N 端片段、C 端片段及中间片段，其中 C 端片段和中间片段较为稳定，且其水平在肾功能不全患者中通常会升高，可反映肾清除功能损伤。

全段甲状旁腺激素测定在区分原发性甲状旁腺功能亢进（甲旁亢）与其它形式的高钙血症（非甲状旁腺引起，如恶性肿瘤、肉瘤和甲亢）方面具有重要意义<sup>2</sup>，是诊断原发性甲旁亢最有效的方法。事实上，在高钙血症患者中，PTH 水平升高通常可诊断为原发性甲旁亢，因为超过 90% 的原发性甲旁亢患者的 PTH 水平会升高。

恶性肿瘤是引起高血钙的其它最常见原因，但其 PTH 水平却在正常范围之内<sup>4</sup>。当以 PTH 水平对血清钙浓度描点时发现，恶性肿瘤引起的高钙血症患者的 I-PTH 水平通常偏低<sup>3,4,5</sup>。

I-PTH 检测与其 C 端片段及中间片段的检测不同，后者在肾功能不全患者中水平显著升高，而前者很少受肾功能减弱的影响<sup>5</sup>。

在甲状旁腺功能减退（甲旁减）导致的低血钙患者中，通常检测不到 PTH，但在甲状旁腺功能部分损失或抑制引起的低血钙患者中，PTH 水平通常在正常范围内。

## 【检验原理】

本试剂盒采用双抗体夹心法，应用了两种不同的抗-人 PTH 山羊多克隆抗体，这两种抗体均经过亲和层析以确保其对 PTH 分子的特异性。其中一种抗体已被生物素标记，与 PTH 的 C 端及中间区域（39-84）结合；另一种抗体则特异性结合 PTH 的 N 端（1-34）并已被辣根过氧化物酶（HRP）标记。

尽管 C 端和中段 PTH 能够与生物素标记抗体结合，但唯有 I-PTH（1-84）才能形成检测所需的夹心复合物。生物素化抗体与微孔内包被的链霉亲和素之间的强亲和力可排除高浓度非活性片段的干扰。

链霉亲和素包被的微孔内表面—生物素标记抗体—I-PTH—HRP 偶联抗体

在本检测中，标准品、质控品或病人样本与生物素标记抗体和酶结合抗体一起加入链霉亲和素包被的微孔内孵育。孵育后通过洗涤除去孔内未结合的抗体及其他组分，加入底物液（TMB）孵育一定时间后加入酸性终止液终止反应，溶液颜色变为黄色，之后在酶标仪上测量吸光度。黄色的强度直接与样本中 I-PTH 的浓度成正比例关系。在直线或对数坐标轴上，以每个标准品的 I-PTH 浓度对其相应的吸光度值描点绘出标准曲线，质控品和样本中的 I-PTH 浓度直接由此标准曲线推算而得。

## 【主要组成成份】

### 1. 链霉亲和素包被的微孔板（PLA）

12×8 孔条（96 孔），附板框。

### 2. 生物素标记的抗-甲状旁腺激素抗体（RGT 1）

1 瓶，7.0 mL。

### 3. 辣根过氧化物酶偶联的抗-甲状旁腺激素抗体（RGT 2）

1 瓶，7.0mL。

### 4. 标准品（CAL A-F）

冻干品。0pg/mL 标准品为含有 BSA 的山羊血清，其它标准品为含有 h-PTH（1-84）、BSA 的山羊血清。标准品 B-F 的理论浓度分别为：10pg/ml，30 pg/ml，100 pg/ml，300 pg/ml，1000 pg/ml。其准确浓度标于瓶身标签，浓度范围在理论浓度的+/-30%内。6 瓶，每瓶 0.5mL。

### 5. 质控品 1&2（CTRL）

冻干品。含有合成 h-PTH（1-84）、BSA 的山羊血清。质控范围请参考瓶上标签。2 瓶，每瓶 0.5mL。

### 6. 浓缩洗液（RGT A）

含有表面活性剂、盐。1 瓶，30mL。

### 7. 四甲基联苯胺（TMB）底物（RGT B）

含有四甲基联苯胺（TMB）、过氧化氢的溶液。1 瓶，20mL。

### 8. 终止液（SOLN）

1N 硫酸。1 瓶，20mL。

### 9. 样本稀释液（RGT 3）

1 瓶，2mL。

### 10. 复溶液（RGT 4）

含有表面活性剂。1 瓶，5mL。

人全段甲状旁腺激素标准品根据室内参考标准品溯源，由商业来源的已纯化的人全段甲状旁腺激素（1-84）生成。参考标准品是通过重量法分析添加的合成 PTH 至基质中生产的，并与已通过 FDA 认证的试剂盒进行对比。内部标准品所用的人全段甲状旁腺激素保持标准化生产。每个标准品的定值均与市售的全段甲状旁腺激素检测试剂盒相关。随后的正常范围研究再次确认校准。

## 自备材料

- 酶标仪;
- 洗板机 (人工洗板亦可);
- 高精度移液器 (25, 100 和 150 $\mu$ L);
- 多通道移液器或移液管 (50, 100 和 150 $\mu$ L) (可选择)。

**【储存条件及有效期】**

本试剂盒的有效期为12个月 (2-8 $^{\circ}$ C下保存)。

除浓缩洗液外其它成分保存在2-8 $^{\circ}$ C下。浓缩洗液在稀释前应保存在室温下以防止形成沉淀。

复溶后的校准品和质控品应尽快置于-20 $^{\circ}$ C下保存, 最长可保存6周, 冻融次数不超过3次。

稀释后的工作洗液在室温下 (18-25 $^{\circ}$ C) 可保存 90 天。

**【适用仪器】**

适用于具有 450nm 和 405nm 波长的所有全自动、半自动酶标仪。

**【样本要求】**

采用血清样本。每个样本双份检测, 需要 50 $\mu$ L 的样本量。样本置于 2-8 $^{\circ}$ C 下可保存 8 小时, -20 $^{\circ}$ C 可保存 4 个月。

**【检验方法】**

**1. 试剂准备**

1) 标准品和质控品: 使用前每瓶加入 500 $\mu$ L 复溶液复溶, 静置 10 分钟后轻缓地反复颠倒瓶子, 确保复溶完全。复溶后立即使用, 未使用的立即冷冻保存于-20 $^{\circ}$ C, 可保存 6 周。最多冻融 3 次。

2) 工作洗液: 稀释前通过摇晃瓶子或 37 $^{\circ}$ C 水浴使沉淀物充分溶解。稀释时将整瓶浓缩洗液 (30mL) 加入到 570mL 蒸馏水或去离子水中并混匀。稀释后室温保存 90 天。

其它试剂直接使用。

**2. 检测步骤**

检测前将所有试剂平衡至室温, 按照**试剂准备**的描述立即复溶标准品和质控品。使用前轻轻混匀所有试剂。

- 1) 将所需数量的链霉亲和素包被的微孔板条置于板框中。
- 2) 于指定孔内各加入 25 $\mu$ L 的标准品、质控品和样本。
- 3) 每孔内加入 50 $\mu$ L 试剂 1 (生物素标记抗体)。
- 4) 每孔内加入 50 $\mu$ L 试剂 2 (酶标抗体)。避光条件下置于旋转器上 (170 $\pm$ 10rpm) 室温 (22 $^{\circ}$ C-28 $^{\circ}$ C) 孵育 3 小时 $\pm$ 30 分钟。
- 5) 洗板 5 次, 每孔分配 0.35mL 工作洗液。
- 6) 每孔内加入 150 $\mu$ L 试剂 B (TMB 底物)。
- 7) 避光条件下置于旋转器上 (170 $\pm$ 10rpm) 室温 (22 $^{\circ}$ C-28 $^{\circ}$ C) 孵育 30 $\pm$ 5 分钟。
- 8) 每孔内加入 100 $\mu$ L 终止液, 轻轻混匀。
- 9) 加入终止液后 10 分钟内依次于酶标仪 450nm 和 405nm 波长处测量吸光度, 以 250 $\mu$ L 蒸馏水或去离子水作为空白对照。

注意: 第二次测量用于增加标准曲线的分析有效性。对于浓度不超过 200pg/mL 的样本, 使用 450nm

处的标准曲线, 而对于浓度超过 200pg/mL 的样本, 则使用 405nm 处的标准曲线。

10) 根据所得标准品的吸光度值及其浓度描点, 通过立方样条曲线、四参数对数曲线或点对点方式计算 I-PTH 的浓度。

**注意事项:**

- 1) 全段 PTH (1-84) 为非常不稳定分子, 应在复溶所有标准品、质控品和病人样本后立即进行检测。
- 2) 建议所有标准品、质控品和病人样本采用双孔进行测定。双孔测定的平均吸光度用于数据处理和结果计算。
- 3) 加样时应避免产生气泡。
- 4) 病人样本值大于最高标准品值 (标准品 F 值接近于 700-1000pg/mL) 时 (见瓶上标签所示正确浓度), 可用试剂 3 (样本稀释液) 进行稀释再重新测定。结果计算时须乘上稀释因子。
- 5) 不同批号的试剂请勿混用。
- 6) 如需保证试剂测定试剂量充足时, 可混和等量试剂 1 (生物素标记的抗体) 和试剂 2 (酶偶联的抗体) 于干净瓶中。然后加入混合后抗体 100 $\mu$ L 至微孔中。合并后的方法可取代步骤 (3) 和步骤 (4), 接下来进行振荡孵育。

**【参考值 (参考范围)】**

应用本试剂盒测定 148 个健康美国人的 I-PTH 水平后获得其范围: 9.0-94pg/mL (血清)。经统计学分析后得到校正后的范围: 10.4-66.5 pg/mL (血清)。

**【检验结果的解释】**

**1. 结果计算**

**手工方法**

- 1) 使用前 5 个标准品 (A-E) 构建 450nm 处的标准曲线, 使用后 3 个标准品 (D-F) 构建 405nm 处的标准曲线。
- 2) 在线性坐标轴上以标准品浓度为 X 轴, 其吸光度为 Y 轴描点。
- 3) 在相邻点间划直线, 形成常见的点对点折线图。根据样本的吸光度值在该折线图中读取其浓度值。浓度不超过 200pg/mL 的样本和质控品, 在 450nm 处的标准曲线上读取结果, 而对于浓度超过 200pg/mL 的样本和质控品, 则在 405nm 处的标准曲线上读取结果。

**自动法**

应用计算机数据处理软件的立方样条曲线或四参数对数曲线进行拟合。

**数据举例 1 (450nm):**

孔别 (pg/mL)	吸光度 (双孔)	吸光度 平均值	I-PTH (pg/mL)	I-PTH (pg/mL) 报告值
标准品 A	0.020 0.016	0.018		0
标准品 B	0.056 0.051	0.054		7
标准品 C	0.124 0.119	0.122		18

标准品 D	0.388 0.393	0.391		55
标准品 E	1.335 1.340	1.338		210
质控 I	0.200 0.200	0.200	27.6	27.6
质控 II	0.804 0.794	0.799	119	119
样本 1	0.147 0.136	0.142	19.1	19.1
样本 2	0.361 0.361	0.361	58.5	58.5
样本 3	2.375 2.454	2.415	>200	*
样本 4	3.725 3.725	3.725	>200	*

数据举例 2 (405nm):

孔别 (pg/mL)	吸光度 (双孔)	吸光度 平均值	I-PTH (pg/mL)	I-PTH (pg/mL) 报告值
标准品 A	0.014 0.008	0.011		0
标准品 D	0.124 0.128	0.126		55
标准品 E	0.428 0.425	0.427		210
标准品 F	1.309 1.317	1.313		700
质控 I	0.074 0.066	0.070	<200	*
质控 II	0.260 0.251	0.256	121	
样本 1	0.049 0.043	0.046	<200	*
样本 2	0.132 0.133	0.133	<200	*
样本 3	0.758 0.782	0.770	401	401
样本 4	1.314 1.321	1.318	>700	稀释后重检

注意: 上述数据仅供举例, 不用于其它结果的计算。

#### 【检验方法的局限性】

检测添加了 2100000 pg/mL 全段 PTH 的样本, 并未发现高值钩状效应。对于 I-PTH 水平高于最高浓度标准品的样本, 应稀释后重新检测。同所有辅助诊断指标一样, 应结合病人的临床表现和其它检测数据对 I-PTH 的结果进行分析评估。

#### 【产品性能指标】

##### 1. 准确度

分别应用本试剂盒和放免法对 309 例病人样本的 I-PTH 水平 (1.0-833pg/mL) 进行了测定, 通过曲线拟合分析后获得以下数据:

本试剂盒结果=1.06-1.49pg/mL

R=0.998, N=309。

##### 2. 灵敏度

本试剂盒的灵敏度即最低检测限, 定义为在 95%

置信区间下可区别于 0 pg/mL 的检测值。本试剂盒的灵敏度为 1.57pg/mL。

### 3. 特异性与交叉反应

本试剂盒中采用的抗体经过亲和层析纯化后可确保其对 PTH 分子的特异性。酶标抗体仅识别 PTH 的 N 端 (1-34), 而生物素标记抗体则对 39-84 片段特异。因此, 只有 I-PTH 能够同时结合酶标抗体和生物素标记抗体从而被唯一检测。

为进一步提高本试剂盒的特异性, 酶标抗体和生物素化抗体及其摩尔比率的优化, 最大限度地降低了 PTH 片段的干扰。PTH 的 N 端 (1-34) 和 C 端 (39-84) 片段在浓度达到 300000pg/mL 的情况下的交叉反应率分别小于 2% 和 0.02%。

### 4. 精密度与重复性

批内差: 应用本试剂盒分别对两个样本进行 25 次检测。

样本	平均值 (pg/mL)	N	变异系数 %
A	32.4	25	6.08
B	178.2	25	3.68

批间差: 应用本试剂盒分别对两个样本进行 21 次检测。由 3 个技术员操作, 使用 2 个不同批号试剂盒, 历时 3 周。

样本	平均值 (pg/mL)	N	变异系数 %
A	30.3	21	3.6
B	159.1	21	2.8

### 5. 回收率

通过向 3 个不同的病人样本中加入不同浓度的 PTH 测定其回收率。所得结果见下表:

血清样本	PTH 内生 pg/mL	PTH 添加 pg/mL	预期值 pg/mL	检测值 pg/mL	回收率 %
A	32.7	132	165	168	102%
	20.6	264	285	288	101%
	13.5	396	410	413	101%
B	68.6	132	201	191	95%
	51.7	264	316	344	109%
	45.0	396	441	462	105%
C	19.9	132	152	165	109%
	15.4	264	279	275	99%
	13.3	396	409	424	104%

均值 103%

### 6. 样本稀释线性

使用试剂 3 (样本稀释液) 稀释 4 个病人血清样本后应用本试剂盒对其进行检测。结果见下表:

样本	稀释度	预期值	观测值	% 观测值 / 预期值
A	未稀释	—	322	—
	1: 2	161	148	92%
	1: 4	80.5	73.1	91%
	1: 8	40.3	41.5	103%
B	未稀释	—	230	—
	1: 2	115	97	84%
	1: 4	58	55	95%
	1: 8	40.3	30	103%

C	未稀释	—	230	—
	1: 2	88	97	93%
	1: 4	44	55	102%
	1: 8	29	30	109%
D	未稀释	—	426	—
	1: 2	213	192	90%
	1: 4	107	90	84%
	1: 8	53	47	89%

均值 95%

## 7. 检测范围

本试剂盒的检测范围为：1.57-1061pg/mL。

### 【注意事项】

1. 本试剂盒内的试剂不含任何人血成分，但病人样本可能出现 HBsAg, HBcAg 或 HIV 抗体阳性，因此必须按照潜在传染物的常规处理方法对未知病人样本进行处理。
2. 终止液由 1N 硫酸组成，虽然经过稀释，但仍具有强腐蚀性并可引起烧伤。因此操作时应小心谨慎，采取适当防护措施避免受伤。一旦溅出，立即用大量水冲洗。

### 【参考文献】

1. Segre, G.V., Niall H.D., Habener J.F. et. al. : Metabolism of parathyroid hormone: physiological and clinical significance. Am. J. Med. 56: 774,1974.
2. Mallete, L.E., Gagel, R.F.: Parathyroid Hormone and Calcitonin. In: Murray J.F. (ed) Primer on the Metabolic Bone Diseases and Disorders of Mineral Metabolism. American Society for Bone and Mineral Research, Kelseyville; William Byrd Press, Richmond, pp. 65-69, 1990.
3. Bilezikian, J.P.: Primary Hyperparathyroidism. In: Murray J.F. (ed) Primer on the Metabolic Bone Diseases and Disorders of Mineral Metabolism. American Society for Bone and Mineral Research, Kelseyville; William Byrd Press, Richmond, pp. 109-111, 1990.
4. Stewart, A.F.: Humoral Hypercalcemia of Malignancy. In: Murray J.F. (ed) Primer on the Metabolic Bone Diseases and Disorders of Mineral Metabolism. American Society for Bone and Mineral Research, Kelseyville; William Byrd Biomerica ELISA = 0.997 IRMA Kit + 2.9 pg/mL r = 0.990 N = 123 Press, Richmond, pp. 115-118, 1990.
5. Mallette, L.E.: The parathyroid polyhormones: New concepts in the spectrum of peptide hormone action. Endocrin. Rev. 12:110-117, 1991.
6. Kruger, L., Rosenblum, S., Zaazra, J. and Wong, J. Intact PTH is stable in unfrozen EDTA plasma for 48 hours prior to laboratory Analysis. Clin. Chem.41:6: page S47, 1995.

更多文献推荐阅读

1. Raisz, L.G., Yajnik, C.H., Bockman, R.S., and Bower, B.B.:

Comparison of commercially available parathyroid hormone immunoassay in the differential diagnosis of hypercalcemia due to primary hyperparathyroidism or malignancy. Ann. Intern. Med. 91:739-740, 1979.

2. Endres, D., Brickman, A., Goodman, W., Maloney, D., and Sherrard, D.: N-Terminal PTH radioimmunoassays in assessment of renal osteodystrophy. Kidney International. 21:132, 1982.
3. Dambacher, M.A., Fischer, J.A., Hunziker, W.H., et.al.: Distribution of circulating immunoreactive components of parathyroid hormone in normal subjects and in patients with primary and secondary hyperparathyroidism: the role of kidney and of the serum calcium concentration. Clin. Sci. 57:435,1979.
4. Kao, P.C., Jiang, N.S., Klee, G.G., and Purnell, D.C.: Development and validation of a new radioimmunoassay for parathyrin (PTH). Clin. Chem. 28:69, 1982.
5. Endres, D.B., Villanueva, R., Sharp, C.F. Jr, Singer, F.R.: Measurement of parathyroid hormone. Endocrinol Metab. Clin. North Am. 18:611-629,1989.
6. Kao, P.C., van Heerden, J.A., Grant, C.S., Klee, G.G., Khosla S: Clinical performance of parathyroid hormone immunometric assays. Mayo Clin. Proc. 67:637-645, 1992.
7. Marcus, R.: Laboratory diagnosis of primary hyperparathyroidism. Endocrinol Metab. Clin. North Am. 18:647-658, 1989.

### 【生产企业】

生产者名称：美国 **BIOMERICA, INC.**

生产者/生产场所地址：17571 Von Karman Avenue, Irvine, CA 92614, U.S.A.

电话：(949) 645-2111

传真：(949) 553-1231

网址：www.biomerica.com

电子邮箱：bmra@biomerica.com

售后服务机构：北京荣志海达生物科技有限公司

地址：北京市海淀区永定路 88 号长银大厦 12 层 B12 室

电话：010-58895646 020-32293176

传真：010-58895611 020-32293177

电子邮箱：info@rz-biotech.com sales@gucon.com

网址：[www.rz-biotech.com](http://www.rz-biotech.com)

### 【医疗器械注册证书编号】

国食药监械（进）字 2014 第 2400232 号

### 【产品标准编号】YZB-USA8001-2013

### 【说明书批准及修改日期】2014 年 1 月 2 日