

## ElisaRSR™ ZnT8 Ab™

### 锌转运体 8 (ZnT8) 自身抗体 ELISA 检测试剂盒说明书

#### 【预期用途】

RSR 公司生产的 ZnT8 自身抗体 (ZnT8 Ab) ELISA 试剂盒仅用于定量检测人血清中的 ZnT8 自身抗体，需专业技术人员操作。

胰岛 β 细胞自身抗体是 1 型糖尿病 (T1DM) 的重要血清标志物，可以识别的抗原包括：胰岛素，谷氨酸脱羧酶 (GAD<sub>65</sub>)，胰岛细胞抗原 IA-2 或者 ICA-512 和锌转运体 8 (ZnT8)。ZnT8 自身抗体识别的抗原决定簇是由 ZnT8 蛋白羧基端 (268-369 残基) 形成的不连续构象决定簇，其中第 325 氨基酸密码子的基因多态性有很大影响。第 325 氨基酸密码子可以表达出 3 种氨基酸：精氨酸 (R) 325，色氨酸 (W) 325 和罕见谷氨酰胺 (Q) 325。ZnT8 自身抗体包括 R325 和 W325 特异性抗体及非特异性抗体，但 Q325 特异性抗体比较罕见。RSR 公司的 ZnT8 自身抗体检测试剂盒可以定量检测 R325/W325 特异性及非特异性的 ZnT8 抗体。

#### 【参考文献】

J. M. Wenzlau et al “The cation efflux transporter ZnT8 (Slc30A8) is a major autoantigen in human type I diabetes.” PNAS 2007 104:17040-17045

P. Achenbach et al “Autoantibodies to zinc transporter 8 and SLc30A8 genotype stratify type 1 diabetes risk.” Diabetologia 2009 52:1881-1888

J. M. Wenzlau et al “Kinetics of the post-onset decline in zinc transporter 8 autoantibodies in type 1 diabetic human subjects.” J ClinEndocrinolMetab 2010 95:4712 - 4719

L. Petruzelkova et al “The dynamic changes of zinc transporter 8 autoantibodies in Czech children for the onset of type 1 diabetes mellitus.” Diabet Med 2014 31:165 - 71

G. Dunseath et al “ Bridging-type enzyme-linked immunoassay for zinc transporter 8 autoantibody measurements in adult patients with diabetes mellitus.” Clin. Chim. Acta. 2015 447:90 - 95

RSR 拥有本产品以下专利：欧洲专利 1563071 B1,2118309 B1;美国专利 7851164 B2,9023984 B2;中国专利 CN1738900B;日本专利 4498144,5694668。

#### 【检测原理】

在 RSR 的 ZnT8 Ab ELISA 检测方法中，患者血清，标准品和质控品中的 ZnT8 抗体经 16-20 小时的孵育可以和微孔板上包被的 ZnT8 蛋白结合。洗掉未结合的抗体后，用生物素标记的 ZnT8 (ZnT8-生物素，ZnT8-Biotin) 进行第二次孵育，这样 ZnT8 自身抗体就在微孔板中同包被的 ZnT8 与 ZnT8-生物素之间形成一个桥梁。洗掉未结合的 ZnT8-生物素，已结合的 ZnT8-生物素的量可利用链霉亲和素-过氧化物酶 (SA-POD) 的显色反应测定。洗去未结合的链霉亲和素-过氧化物酶，加入过氧化物酶底物四甲基联苯胺 (TMB)，可形成蓝色复合物。加入终止剂终止反应后，复合物由蓝色变为黄色，分别在波长 450nm 和 405nm 读取吸光度。当

450nm 吸光值较高时，建议在 405nm 读数后转换为 450nm 的吸光值，如果只可使用一个波长检测，建议使用 405nm 读数。检测范围为 15-2000 u/mL （RSR 单位）。

**【样本要求及贮存】**









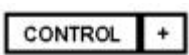

待检样本应立即分离出血清进行检测，或分装后在-20℃ 保存。尽量避免反复冻融，防止贮存温度过高。

每份样本检测需要 50μL 血清（每孔 25μL，实验建议进行复孔）。

避免使用脂血、溶血的样本。可使用柠檬酸盐或者肝素作为抗凝剂的血浆样本进行检测。研究表明，当使用 EDTA 作为抗凝剂时，ZnT8 抗体阳性的血浆样本吸光度值受影响变低。具体为 19 个 EDTA 血浆样品含有不同浓度 ZnT8 抗体同对应血清样品（血清 ZnT8 抗体浓度范围是 11-326 u/mL）比较，OD450 值要降低 33%-65%，u/mL 值要降低 37%-64%。

需要时，在室温下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：10000-15000g，离心 5 分钟），请勿省略离心处理步骤。

**【标识及含义】**

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

**【实验设备】**

能调剂 25μL 和 100μL 的微量加样器

复溶及稀释试剂的量具

纯水

酶标仪（含 405nm 和 450nm 波长）

ELISA 孔板振荡器（可达 500 次/分的非垂直振荡器）

ELISA 孔板盖

### 【试剂盒组成】

A	ZnT8 包被的微孔板（96 孔），每个孔架包括 12 条，每条 8 孔，密封保存。开封前室温（20-25℃）放置 30 分钟
	微孔条需与底架牢固结合，未使用的板条同干燥剂要放回原铝箔袋，用胶带密封后放入可封口塑料袋，可在 2-8℃ 下保存 1 个月
B1-5	标准品 5 瓶，每瓶 0.7mL，浓度分别为 10、20、75、500、2000 u/mL（RSR 单位），直接使用
C1-2	阳性质控品 I 和 II，每瓶 0.7mL（浓度详见标签），直接使用
D	阴性质控品，0.7mL 直接使用
E	ZnT8-生物素（3 小瓶，冻干粉）
	每瓶 ZnT8-生物素在使用前用 5.5mL 的生物素复溶缓冲液进行复溶（F）。当使用多瓶时，将其合在一起充分混匀使用。溶解后可在 2-8℃ 保存 3 天
F	ZnT8-生物素复溶缓冲液（2×15mL 红色）直接使用
G	浓缩的链霉亲和素-过氧化物酶（SA-POD，1 瓶 0.7mL）
	用 SA-POD 稀释液（H）进行 20 倍稀释。例如，0.5mL（G）+ 9.5mL（H）。稀释的 SA-POD 在 2-8℃ 保存不超过 16 周
H	SA-POD 稀释液（15mL）直接使用
I	过氧化物酶底物（四甲基联苯胺，TMB，15mL）直接使用
J	浓缩洗涤缓冲液（125mL，10 倍浓缩）。
	使用前，用纯水稀释。例如，100mL（J）+ 900mL 纯水。稀释的洗涤缓冲液在有效期内 2-8℃ 保存
K	终止液（12mL）直接使用

### 【实验步骤】

除 ZnT8-生物素及其复溶缓冲液外，其它所有的试剂需在使用当天置于室温下（20-25℃）复温。在步骤 4、7、10、11 中建议使用 Eppendorf 连续加样器。

第一天	1	在相应的板孔中加入 25μL 标准品（B1-5）、质控品（C1-2 和 D）和患者血清。建议做复孔，设置 2 个空白孔（见步骤 12）。
	2	盖上微孔板盖，将微孔板置于 ELISA 板振荡器上混匀 5 秒钟，2-8℃ 孵育过夜，16-20 小时，无需振荡。
第二天	3	用洗板机抽出微孔板内液体，并用已稀释的洗液（J）清洗孔板 3 次。如手工洗板，应快速弃去反应液，手动洗涤三次后，倒置在吸水纸上将多余的液体拍干。
	4	除空白孔外，用加样器向其余各孔中加入 <b>低温复溶的 ZnT8-生物素</b> （E）100μL。加样过程中防止液体的溅出。
	5	盖好微孔板盖，将微孔板置 2-8℃ 孵育 1 小时，无需振荡。
	6	重复步骤 3。
	7	除空白孔外，用加样器向各孔中加入 100μL 已稀释的链霉亲和素-过氧化物酶(G)。
	8	盖好微孔板，置于 ELISA 板振荡器上，室温振荡 20 分钟（500 次/分）。
	9	重复步骤 3，如采用手工洗板，则用已稀释的洗液洗 3 次，纯水洗 1 次以除去气泡，而后在吸水纸上将多余的液体拍干。
	10	每孔中加入 100μL 的 TMB（I），室温避光放置 20 分钟，无需振荡。

11	每孔中加入 100μL 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	30 分钟内,用酶标仪在波长 405nm 和 450nm 下分别读取每孔的吸光度 OD 值,并扣除只含 100μL 酶反应底物 TMB (I) 和 100μL 终止液 (K) 的空白孔吸光度。

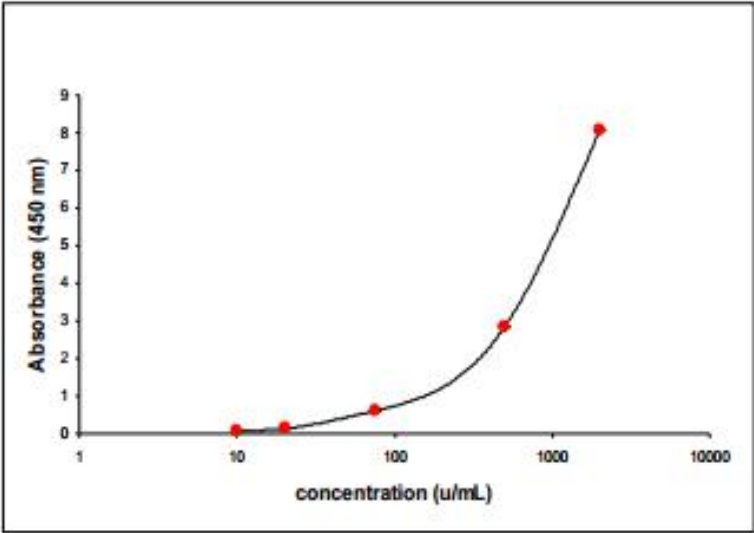
【结果分析】

绘制标准曲线, X 轴为浓度 (对数模式), Y 轴为吸光度 OD 值 (线性模式)。患者血清中的 ZnT8 自身抗体浓度可以通过标准曲线读出。(RSR 采用对数/线性样条曲线, 曲线平滑系数=0)。亦可采用其他数据处理系统。阴性质控品 (D) 的 ZnT8 自身抗体浓度为 0 u/mL, 也可以设定为 1 u/mL, 以便软件结果处理。当样本抗体浓度较高时, 可用阴性质控品 (D) 进行稀释, 例如, 15μL 的样本加入 135μL 的阴性质控品, 相当于 10 倍稀释。其他浓度稀释液 (例如 100 倍) 可以从 10 倍稀释液制备或视情况而定。一些样本血清经过稀释后不会呈线性变化。

【举例】

标准品	450nm 吸光度	浓度 u/mL	405nm 吸光度	浓度 u/mL
B1	0.068	10	0.023	10
B2	0.138	20	0.043	20
B3	0.610	75	0.184	75
B4	2.838	500	0.853	500
B5	8.089	2000	2.379	2000
阴性质控 D	0.015	0	0.008	0
阳性质控 C1	0.402	46	0.121	46
阳性质控 C2	1.221	200	0.367	196

注: 若 450nm 吸光度值在 3.0 以上, 可以用 405nm 的吸光度值乘上一个适当的系数即可转换为 450nm 的吸光值 (RSR 酶标仪系数为 3.4)。



【临界值】

阴性	<15 u/mL
阳性	≥15 u/mL

本临界值为 RSR 测定所得。然而每个实验室应建立自己的锌转运体 8 自身抗体水平的正常及病理参考范围。同时建议各实验室建立自己的对照样品用于试验质控。

### 【性能评价】

#### 【特异性和灵敏度】

在 IASP 2015 研究中，该试剂盒的特异性为 97% (n=90)，灵敏度为 76% (n=50)。用此试剂盒检测 300 例健康志愿者的血清，297 例 ZnT8 Ab 检测结果为阴性，其平均值为 1.9 u/mL，标准差为 3.84 u/mL。3 例 (1%) 为阳性，具体浓度分别为 45、41 及 19 u/mL。

#### 【检测下限】

将本试剂盒的阴性质控品检测 20 次，计算平均值和标准差，2 倍标准差的检测下限为 1.2 u/mL。同时阴性质控品浓度指定为 1u/mL。

#### 【批间精密度】

样本	平均值 u/mL (n=20)	CV(%)
A	102	9.3
B	64	7.5
C	26.6	8.7

#### 【批内精密度】

样本	平均值 u/mL (n=25)	CV(%)
1	160	6.2
2	63	6.2
3	24.5	3.5

#### 【临床准确性】

用本试剂盒对非 1 型糖尿病的自身免疫疾病患者血清进行检测，结果显示类风湿因子阳性样本 (n=26) 及以下自身抗体阳性样本：甲状腺球蛋白抗体 (n=20)，甲状腺过氧化物酶抗体 (n=24)，水通道蛋白 4 抗体 (n=4)，乙酰胆碱受体抗体 (n=9)，对本检测结果无影响，无干扰。4% (n=24) TSH 受体抗体阳性样本及 9% (n=23) 21 羟化酶抗体阳性样本在此 ZnT8 抗体检测中呈阳性。

#### 【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 500mg/dL，胆红素 20mg/dL，脂肪乳剂 3000mg/dL 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。请注意标签上注明的有效期和复溶试剂的稳定性。详细的安全信息参见材料安全数据清单。试剂盒中的所有组分应避免食入，吸入和直接接触到皮肤、衣服。穿用防护衣。本试剂盒中所用的人源性材料与 HIV1，HIV2，HCV 抗体，及 HBsAg 并无反应，且已经得到验证，但我们在处理这些潜在的感染

也应该多注意。如果存在污染，请在离开实验室之前彻底地洗手。在处理包括样本在内的潜在污染废物前，应对其进行灭菌。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。试剂盒中包含一些作为防腐剂的组分，如少量的叠氮化钠。因此试剂盒中的所有组分应避免食入、吸入、注射和直接接触皮肤、眼睛和衣服。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。

**【简要操作步骤】**

第一天	除 ZnT8-生物素及其复溶缓冲液外，其它试剂需在使用当天置于室温下（20-25℃）静置复温。	
	加样	加入 25μL 标准品，质控品及患者血清（预留空白孔），振荡混匀 5 秒钟。
	孵育	2-8℃ 孵育过夜 16-20 小时，无需振荡。
第二天	吸空	微孔板。
	洗板	3 次（如手工洗板，洗板后应倒置在吸水纸上拍干）。
	加样	加入低温复溶的 ZnT8-生物素 100μL（空白孔除外）
	孵育	2-8℃ 孵育 1 小时，无需振荡。
	吸空	微孔板。
	洗板	3 次（如手工洗板，洗板后应倒置在吸水纸上拍干）。
	加样	加入已稀释的链霉亲和素-过氧化物酶 100μL（空白孔除外）。
	孵育	ELISA 板振荡器上室温振荡 20 分钟（500 次/分）。
	吸空	微孔板
	洗板	3 次（如手工洗板，用已稀释的洗液洗 3 次，纯水洗 1 次，拍干）*。
	加样	每孔中加入 TMB 100μL。
	孵育	室温避光放置 20 分钟。
	加样	每孔中加入终止液 100μL，在振荡器上振荡约 5 秒钟。
反应终止后 30 分钟内，分别在 405nm 和 450nm 读取吸光度值。		
*当使用洗板机进行洗板时无须拍干，同时省去纯水洗板的步骤。		