

# 胰岛细胞自身抗体三联 ELISA 检测试剂盒说明书

## 预期用途

胰岛细胞自身抗体通过对胰岛素、谷氨酸脱羧酶 65（GAD65）、胰岛素瘤抗原-2（IA-2）和锌转运体 8（ZnT8）等抗原的识别，成为 1 型糖尿病（Type 1 Diabetes Mellitus）重要的血清诊断标志物。RSR 公司的胰岛细胞自身抗体三联（3 screen ICA）ELISA 检测试剂盒仅用于定量联合检测人血清中的谷氨酸脱羧酶 65（GAD65）、胰岛素瘤抗原-2（IA-2）和锌转运体 8（ZnT8）三种自身抗体的综合水平，可用于诊断及预测 1 型糖尿病。适用于各级医院临检实验室并可与自动化检测系统配套使用，需专业技术人员操作。

## 参考文献

M. Amoroso et al

“3 Screen islet cell autoantibody ELISA: A sensitive and specific ELISA for the combined measurement of autoantibodies to GAD<sub>65</sub>, to IA-2 and to ZnT8.”

Clin. Chim. Acta. 2016 462:60–64

A. G. Ziegler et al

“3 Screen ELISA for high-throughput detection of beta cell autoantibodies in capillary blood.”

Diabetes Technol. Ther. 2016 18:687–693

## 产品专利

RSR 拥有的本试剂盒在独家专利包括：中国专利 ZL 02822274.1；美国专利 8,129,132 B2；欧洲专利 EP 1448993 B1；印度专利 226484；日本专利 5711449。

同时也具有其他相关专利授权，包括：中国专利 CN1738900B；美国专利 7,851,164 B2、9,023,984 B2、6,682,906 B1、6,277,586 B1；欧洲专利 EP 1563 071 B1、EP 2 118 309 B1；日本专利 4498144、5694668。

## 检测原理

RSR 公司胰岛细胞自身抗体三联 ELISA 试剂盒的检测原理的依据是 GAD65、IA-2、ZnT8 三种胰岛细胞自身抗体均具有的 Y 型结构，一侧与共同包被在微孔板内的 GAD65、IA-2、ZnT8 联合抗原结合，另一侧与生物素标记的联合抗原结合，从而形成桥式结构。已结合的生物素标记联合抗原与样本血清、校准品及质控品中的三种抗体综合浓度一致。由于生物素可与链霉亲和素-过氧化物酶（SA-POD）特异地结合，并利用过氧化物酶与其底物（TMB）的显色反应，分别在波长 450nm 和 405nm 读取吸光值，从而计算出 GAD65、IA-2、ZnT8 三种胰岛细胞自身抗体的综合含量。吸光值越高代表三种胰岛细胞自身抗体综合浓度越高。检测范围为 5-2000u/mL（RSR 浓度单位）。

## 待检样本要求及储存

待检样本应立即分离出血清进行检测，或分装储存于-20℃。每份待检样本需要 50μL 血清（每孔 25μL，建议复孔检测）。

避免使用脂血、溶血样本，不宜使用血浆进行检测。尽量避免反复冻融，防止储存温度过高。需要时，在室温下解冻待检血清并轻轻混匀。

检测前用离心机离心待检血清（推荐速度：10,000-15,000 x g，离心 5 分钟）以去除微粒

物质。当血清浑浊或有颗粒时，请勿省略此离心处理步骤。

**检测需要但试剂盒中未提供的材料**

能够调剂 25μL、50μL 和 100μL 的移液器。

能够配给多种体积，用以复溶或稀释的方法。











纯水。

具有 405nm 和 450nm 检测波长的酶标仪。

ELISA 板振动器，500 次/分钟（非定轨震动器）。

ELISA 板盖。

**标识及含义**

符号	含义
	仅供研究用途
	产品编号
	批号
	参阅使用说明
	生产商
	规格
	有效日期
	储存温度
	阳性质控品
	阴性质控品

**试剂盒组成**

未拆封的试剂盒应储存于 2-8℃。

A	三联抗原包被微孔板（96 孔），每个孔架包含 12 条，每条 8 孔，密封保存。
	微孔条需与底架紧密结合，未使用的板条需放回原铝箔袋，加入干燥剂，密封后放入自封口塑料袋，在 2-8℃ 可保存 2 周。
B	阴性质控品，0.3mL，开瓶即用。
C1	谷氨酸脱羧酶抗体阳性质控品，0.3mL，开瓶即用。
C2	胰岛素瘤抗原-2 抗体阳性质控品，0.3mL，开瓶即用。
C3	锌转运体 8 抗体阳性质控品，0.3mL，开瓶即用。
D	参考液,0.3mL,开瓶即用
E1-5	校准品(非必需)

	浓度分别为 5、15、100、400、2000u/mL (RSR 浓度单位), 5×0.3mL 开瓶即用。
F	浓缩洗涤缓冲液, 125mL。
	使用前需用纯水 10 倍稀释, 在 2-8°C 可保存至试剂盒有效期。
G	生物素标记的三联抗原 3 瓶, 冻干粉。
	每瓶三联抗原-生物素在使用前需用 5.5mL 的生物素复溶 (C) 液进行复溶。当使用多瓶时, 单独复溶后合并混匀使用。
H	三联抗原-生物素复溶液, 3x15mL, 红色, 开瓶即用。

J	浓缩链霉亲和素-过氧化物酶 (SA-POD), 0.7mL。
	使用前需用 SA-POD 稀释液 (E) 进行 20 倍稀释。例如, 0.5mL (D) +9.5mL (E)。稀释的 SA-POD, 在 2-8°C 可保存 28 周。
K	SA-POD 稀释液, 15mL, 开瓶即用。
L	过氧化物酶底物 (TMB), 15mL, 开瓶即用。
M	反应终止液, 12mL, 开瓶即用。

### 实验步骤

除三联抗原-生物素和三联抗原-生物素复溶液外, 其余试剂在检测前需在室温下 (20-25°C) 平衡至少 30 分钟。在步骤 4, 7, 10 和 11 中建议使用 Eppendorf 移液器。

1. 将 25μL 样本血清、校准品 (E1-5) (如使用), 质控品 (B 和 C1-3) 以及参考液 (D) 加入相应三联抗原包被微孔 (A), 建议做复孔, 设置一个孔空白 (见步骤 12)。
2. 盖上车盖, 振荡约 5 秒钟 (500 次/分钟), 然后在 2-8°C 孵育过夜 (16-20 小时), 无需振荡。
3. 洗板机抽出孔内液体, 然后用稀释的洗液 (F) 清洗三次。如手工洗板, 快速倒置孔板去除孔内液体, 手动冲洗三次, 然后倒置在吸水纸上将多余的液体拍干。
4. 将 100μL 复溶后的低温三联抗原-生物素 (G) 加入各孔内, 空白孔除外。加样过程中应注意避免液体溅出。
5. 盖上车盖, 将微孔板在 2-8°C 放置 1 小时, 无需振荡。
6. 重复步骤 3
7. 将 100μL 稀释的链霉亲和素-过氧化物酶 (J) 加入各孔内, 空白孔除外。
8. 盖上车盖, 在室温下 (20-25°C), 振荡 20 分钟 (500 次/分钟)。
9. 重复步骤 3, 如手工洗板, 拍干前需多加一次纯水冲洗, 以除去孔内泡沫。
10. 将 100μL 过氧化物酶底物 TMB (L) 加入各孔内, 包括空白孔。在室温下 (20-25°C), 避光放置 20 分钟, 无需振荡。
11. 将 100μL 反应终止液 (M) 加入各孔内, 包括空白孔。盖上车盖, 振荡约 5 秒钟 (500 次/分钟), 确保各孔的底物孵育时间相同。
12. 反应终止后 10 分钟内, 用酶标仪分别在 405nm 和 450nm 波长读取吸光值, 并以只含 100μl TMB 和 100μl 终止液的孔作为空白对照。

结果分析

当实验设计中未包含校准品时:

样本中三联抗体的浓度以指数表示,计算方式为:

样本指数 =  $\frac{\text{样本的450nm OD值}}{\text{参考液的450nm OD值}} \times 100$

本指数中 OD 值也可使用样本在 405nm 下的 OD 值计算.

在 1200 例健康男性成年人血清样本中完成本检测,有 97%样本测得指数值小于 30.我们建议 30 可作为阳性样本的临界值.(详见”临床灵敏度与特异性”一章)”

结果范例:(仅做参考,请勿用于实际检测)

	A450 nm	指数	A405 nm	指数
参考液 (D)	0.702	100	0.222	100
阴性质控 (B)	0.030	4.3	0.009	4.1
阳性质控 (C1)	1.300	185	0.412	186
阳性质控 (C2)	0.387	55	0.123	55
阳性质控 (C3)	0.181	26	0.057	26

当实验设计中包含校准品时:

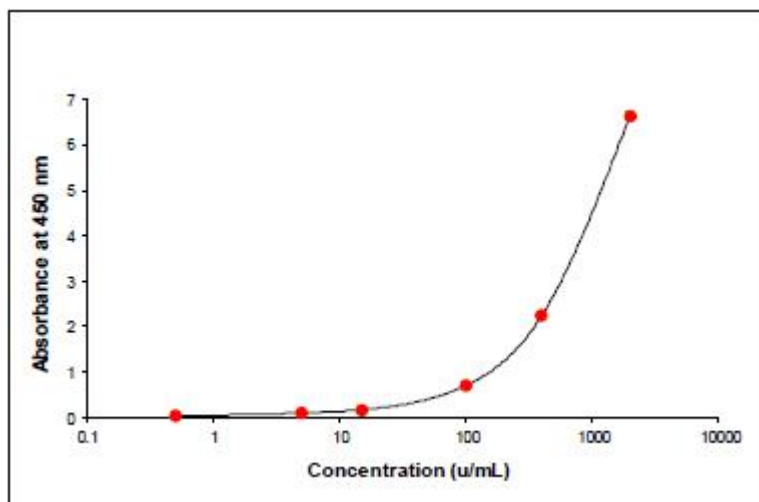
以浓度（对数模式）为 X 轴，吸光值（线性模式）为 Y 轴，绘制标准曲线。样本血清中的 GAD65、IA-2、ZnT8 三种抗体的综合浓度可以通过标准曲线读出（RSR 使用的是 log/lin spline 曲线，曲线平滑系数为 0）。阴性质控品（K）的浓度为 0u/mL，但利用计算机辅助处理数据时，可以设为 0.5u/mL。当样本浓度较高时，可用阴性质控品（K）进行稀释。例如，需 10 倍稀释时，将 15μL 样本血清加 135μL 阴性质控品。其他稀释倍数（如 100 倍）可从 10 倍稀释液制备或视情况而定。某些血清不能以线性进行稀释。

范例（仅作示例，请勿用于实际结果的计算）

校准品	450nm 吸光值	浓度(u/mL)	405nm 吸光值	浓度 (u/mL)
E1	0.094	5	0.030	5
E2	0.167	15	0.052	15
E3	0.702	100	0.222	100
E4	2.233	400	0.711	400
E5	6.637	2000	1.952	2000
阴性质控品 (B)	0.030	0	0.009	0
阳性质控品 (C1)	1.300	217	0.412	209
阳性质控品 (C2)	0.387	55	0.123	58
阳性质控品 (C3)	0.181	13.4	0.057	13.6

注：当 450nm 吸光值大于 3.0 时，可将 405nm 吸光值乘以一个适当的系数转换为 450nm 吸光值（RSR 酶标仪系数为 3.4）。

标准曲线图例:(仅做参考)



本说明书引用的数据皆仅作参考用途。建议每个实验室在检测样本中包括自己的质控样本系列，并应建立自己的 GAD65、IA-2、ZnT8 三种自身抗体综合水平的正常及病理参考范围。

## 临床效能评价

### 临床灵敏度与特异性

在 1200 例健康男性成年血清样本中测得 1166 例(97%)指数小于 30.在 34 例得到 30 以上的指数值的样本中,31 例在随后的抗体单项检测中得到阳性结果.

在 147 例 1 型糖尿病患者中(其中多数病程较久),126 例(86%)测得 30 以上指数值.同时这些阳性结果与其在单项检测中结果一致性强(一致率 94%)

### 临床准确性

在 108 例 Graves 病患者样本中,6 例(5.4%)测得三联抗体阳性(以 30 以上计).6 例中有 5 例在接受单项抗体检测中发现存在至少一种抗体为阳性.

在其他疾病患者样本中发现三联检测结果阳性,且单项抗体检测亦为阳性:

3/10 Addison 病;(30%)

3/29 乳糜泻病(10%)

1/20 类风湿关节炎(5%)

### 全性

本试剂盒仅用于体外检测，需由专业技术人员根据说明书进行操作。请注意签上注明的有效期和溶解试剂的稳定性。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 HBs 抗原均无反应，且已经得到验证。但在处理这些材料时，应按潜在感染源处理。如果发生污染时，在离开实验室之前应彻底的洗手。

包括样本在内的潜在污染废物，在处理之前应进行高温消毒。本试剂盒涉及的非人源性材料（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感染源进行处理。试剂盒中有一些组分含有少量叠氮化钠作为防腐剂。试剂盒中的所有组分应避免食入、吸入、注射或直接接触到皮肤、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，以避免形成重金属复合物。

### 简要实验步骤

除三联抗原-生物素和三联抗原-生物素复溶液外，其余试剂及样本血清在检测前需在室温下（20-25℃）平衡至少 30 分钟。		
	加样	将 25μL 校准品（E1-5）(非必需)、质控品（B 和 C1-3）,参考液(D) 及样本血清加入相应孔内，空白孔除外。
	混匀	振荡约 5 秒钟（500 次/分钟）。
	孵育	2-8℃ 孵育过夜（16-20 小时），无需振荡。
	弃去反应液	微孔板（A）。
	洗板	3 次（如手工洗板，洗板后应倒置在吸水纸上拍干）。
	加样	将 100μL 低温复溶三联抗原-生物素（G）加入各孔内，空白孔除外。
	孵育	2-8℃ 孵育 1 小时，无需振荡。
	弃去反应液	微孔板（A）。
	洗板	3 次（如手工洗板，洗板后应倒置在吸水纸上拍干）。
	加样	将 100μL 1:20 稀释的 SA-POD（J）加入各孔内，空白孔除外。
	孵育	室温振荡 20 分钟，（500 次/分钟）。
	弃去反应液	微孔板（A）。
	洗板	3 次（如手工洗板，拍干前需多加一次纯水冲洗）。
	加样	将 100μL TMB(L)加入各孔内，包括空白孔。
	孵育	室温避光放置 20 分钟，无需振荡。
	加样	将 100μL 终止液(M)加入各孔内，包括空白孔，并振荡 5 秒钟。
加入终止液 10 分钟内，分别在波长 405nm 和 450nm 读取吸光值。		