

## 21-羟化酶自身抗体 ELISA 检测试剂盒使用说明

### 预期用途

RSR 公司生产的 21-羟化酶自身抗体(21-OH Ab)ELISA 检测试剂盒仅用于定量检测人类血清中 21-OH Ab。需专业技术人员操作。

21-羟化酶抗体的产生与肾上腺皮质的自身免疫性损伤有关。作为 Addison s 病的特异性抗体与 I 型或 II 型多内分泌腺自身免疫综合征(APS)的抗体之一，本抗体对于诊断及治疗肾上腺自身免疫病具有重要价值。

### 参考文献

J. Furmaniak and B. Rees Smith

Editorial: Adrenal and Gonadal Autoimmune Diseases.

J. Clin. Endocrinol. Metab. 1995 80: 1502-1505

S. Chen et al

Autoantibodies to Steroidogenic Enzymes in Autoimmune Polyglandular Syndrome, Addison's Disease, and Premature Ovarian Failure.

J. Clin. Endocrinol. Metab. 1996 81: 1871-1876

H. Tanaka et al

Steroid 21-Hydroxylase Autoantibodies: Measurements with a New Immunoprecipitation Assay.

J. Clin. Endocrinol. Metab. 1997 82: 1440-1446

G. Coco et al

Estimated Risk for Developing Autoimmune Addison's Disease in Patients with Adrenal Cortex Autoantibodies.

J. Clin. Endocrinol. Metab. 2006 91: 1637-1645

E. S. Husebye et al

Consensus Statement on the Diagnosis, Treatment and Follow-up of Patients with Primary Adrenal Insufficiency.

J. Intern. Med. 2014 275(2):104-15

### 检测原理

RSR 公司的 21-OH Ab ELISA 检测试剂盒中，标准品、质控品、以及患者血清中的人 21-OH Ab 将会与 ELISA 微孔板中包被的 21-OH 抗原相结合。16-20 小时孵育后弃去液体留下与固定抗原结合的抗体。在第二次孵育中，向微孔中加入生物素标记的 21-OH 用以结合被固定 21-OH 结合的 21-OHAb。被微孔板结合的生物素标记 21-OH 的量可由第三次孵育中加入的链霉亲和素-过氧化物酶测定，原理基于生物素与链霉亲和素之间的特异性结合。弃去过量的链霉亲和素过氧化物酶后向微孔内加入四甲基联苯胺（TMB）进行蓝色显色反应。反应通过加入终止液终止反应并转为黄色，随后在 405nm 和 450nm 下使用酶标仪读取每个微孔内液体的吸光度。吸光值越高说明样本中 21-OH 抗体的浓度越高。405nm 的读数可以用来

定量高吸光值样本的浓度。对低吸光值样本的定量建议使用 450nm 的读数。如果只使用一个检测波长，建议使用 405nm 检测。

**待测血清样本的贮存和制备**

待测血清应该在分离后迅速进行检测或-20℃分装贮存。每份样本需要 100μL 血清（以两份 50μl 计算）尽量避免反复冻融，防止储存温度过高，不正确的贮存样本会造成抗体活性下降或丢失。避免使用脂血、溶血的样本。

使用前将待测血清回温至室温并轻轻混匀。当血清含有絮状物或者颗粒时，需要离心以沉淀颗粒物质（例如：相对离心力 10000g，离心 5 分钟），请勿省略离心处理步骤。

**IFU 符号**

符号	含义
	欧洲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
	含量充足
	有效日期
	贮存温度
	阳性质控
	阴性质控

**实验设备**

微量加样器：量程分别为 50μL 和 100μL。

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。

酶标板振荡器，可以达到 500 次/分钟（非定轨振荡器）。

ELISA 微孔板盖。

ELISA 洗板机。

## 试剂盒组成

未拆封的试剂盒及其组份应贮存于 2-8℃。

<b>A</b>	<b>21-OH 包被微孔板</b> 每个框架中设 12 个板条，每条 8 孔（共 96 孔），密封保存于箔袋中。开封前提前室温（20-25℃）放置至少 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，置于 2-8℃ 保存。有效期 6 个月。
<b>B</b>	<b>阴性对照</b> 0.7mL 直接使用
<b>C1-2</b>	<b>阳性对照 1、2(质控范围见瓶身)</b> 2×0.7mL 直接使用
<b>D</b>	<b>参照样本</b> 0.7mL 直接使用
<b>E1-4</b>	<b>标准液（选用）</b> 0.3, 1.0, 10, 100u/mL(RSR 单位) 4×0.7mL 直接使用
<b>F</b>	<b>反应增强剂</b> 6mL 红色液体 直接使用
<b>G</b>	<b>生物素结合的 21-OH。</b> 3 瓶 冻干粉
	使用前用回至室温的复溶液(H)5.5mL/瓶复溶，现用现配。当需要使用 1 瓶以上时，复溶后合并，轻摇以混匀。
<b>H</b>	<b>生物素标记的 21-OH 稀释液</b> 2×15mL 直接使用
<b>J</b>	<b>链霉亲和素-过氧化物酶(SA-POD)</b>
	用 SA-POD 稀释液(I)以 1:20 稀释，例如 0.5mL SA-POD(H)+9.5mL 稀释液(I)。稀释后在 2-8℃下可保存 16 周。
<b>K</b>	<b>链霉亲和素-过氧化物酶稀释液</b> 15mL 直接使用
<b>L</b>	<b>过氧化物酶底物(TMB)</b> 15mL 直接使用
<b>M</b>	<b>终止液</b> 12mL 直接使用

N	浓缩洗涤液
	125mL
	使用前用纯水进行 10 倍稀释，稀释后在 2-8℃下可保存至试剂盒有效期。

### 实验步骤

在第一天的步骤中，步骤 1 至步骤 3 中涉及的所有试剂，使用前需室温放置(20-25℃)至少 30 分钟；

在第二天的步骤中，步骤 4 至步骤 13 中涉及的所有试剂(除已加样的微孔板外)，使用前需室温放置(20-25℃)至少 30 分钟。第一天中已加样的微孔板在步骤 4 中请勿回温，2-8℃中取出直接操作；

在第五步之前请勿复溶 21-OH 生物素。在步骤 2,5,8,11,12 中建议使用 Eppendorf 连续移液器。

第一天	1	将 50μL 样本血清，阴性质控品 (B)，阳性质控 (C1-2)，参照样本 (D) 和 (选用) 标准品 (E1-4) 分别加至各自微孔中，留空一个微孔作为空白对照。样本建议做双孔。
	2	每孔中加入 50μL 反应增强剂(F)。空白除外。
	3	盖好微孔板，将微孔板至于 ELISA 板振荡器，振荡 1 分钟 (500 次/分)。完成后在 2-8℃下孵育 16-20 小时，过程中请勿振荡。
第二天	4	使用稀释好的洗涤液液(N)在洗板机上进行三次洗板。
	5	复溶生物素结合的 21-OH(G)，并向每孔中加入 100μL。空白除外。
	6	盖好微孔板，将微孔板至于 ELISA 板振荡器，室温振荡 1 小时 (500 次/分)。
	7	重复步骤 4。
	8	每孔中加入稀释好的 SA-POD(H)100μL。空白除外。
	9	盖好微孔板，将微孔板至于 ELISA 板振荡器，室温振荡 20 分钟 (500 次/分)。
	10	重复步骤 4。
	11	每孔中加入 100μL 过氧化物酶底物 TMB(L)(含空白孔)，室温下避光孵育 20 分钟，请勿振荡。
	12	每孔中加入 50μL 终止液(M)(含空白孔)，盖好微孔板在室温下用振荡器振荡 5 秒。确保每孔中底物孵育情况一致。
	13	20 分钟内使用酶标仪在 450nm 和 405nm 波长下读取每孔 OD 值。空白孔中应只含有 100μL 底物(J)和 50μL 终止液(K)。

### 结果分析

#### 不使用标准品计算结果

#### 指数 (Index) 计算

指数值可以通过以下公式计算获得：

$$\text{Index} = (\text{样本的 } 450\text{nm 吸光值} / \text{参照样本的 } 450\text{nm 吸光值}) \times 100$$

此指数值也可以用 405nm 吸光值计算。

结果范例 (仅作示例，不用于实际结果计算)

	450nm 吸光度	指数值	405nm 吸光度	指数值
参照样本 (D)	0.728	100	0.232	100
阴性质控 (B)	0.09	12	0.028	12
阳性质控 (C1)	0.464	64	0.151	65
阳性质控 (C2)	1.684	231	0.541	233

检测临界值

阴性	< 45
阳性	≥ 45

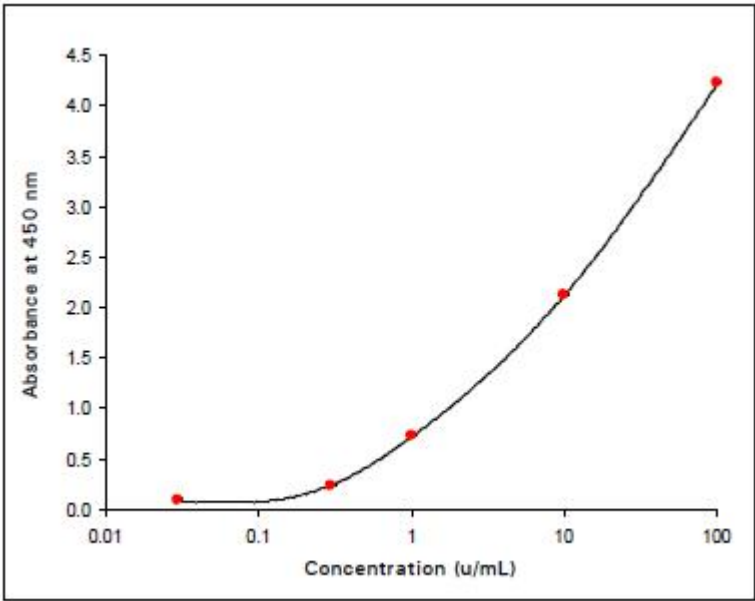
使用标准品计算结果 (选用)

标准曲线可以通过 X 轴的标准品浓度 (对数模式) 与 Y 轴的标准品的吸光度(线性模式)建立。患者血清中 21-OH Ab 浓度可以从标准曲线中读出。此说明书数据是 RSR 基于样条曲线 (Spline cubic) 绘制，平滑因数=0。阴性对照品在结果计算中可指定为 0.03u/mL 以辅助结果处理。

标准曲线范例 (仅作示例，不用于实际结果计算)

	450nm 吸光度	浓度 u/mL	405nm 吸光度	浓度
阴性对照 (B)	0.090		0.028	
E1	0.231	0.3	0.073	0.3
E2	0.728	1	0.232	1
E3	2.121	10	0.679	10
E4	4.223	100	1.242	100
阳性对照 C1	0.464	0.57	0.151	0.59
阳性对照 C2	1.684	5.37	0.541	5.32

对于 450nm 吸光值大于 3 的读数，可使用 405nm 吸光值乘以适当的系数转换成 450nm 吸光值。(RSR 仪器的系数为 3.4)。



当样本中 21-OH Ab 浓度大于 100u/mL 时可用 21-OH Ab 阴性对照品稀释。一些血清的稀释不会呈线性。

**检测临界值**

Cut off	u/mL
阴性	<0.4
阳性	≥0.4

本临界值由 RSR 测定。各实验室应建立自己的健康及病理 21-OH 抗体水平的参考范围。同时推荐各实验室使用自己的对照样本进行测定。

**性能评价**

**临床特异性**

用本试剂盒对 928 名健康志愿者的血清进行检测，922（99.4%）例样本的 21-OH Ab 检测结果为阴性，6（0.6%）例样本全部发现含有 21-OH 的 IgM 抗体，检测浓度分别为 0.59 u/mL，0.93 u/mL，1.2 u/mL，2.4 u/mL，>100 u/mL，>100 u/mL。

**临床灵敏度**

用本试剂盒对 100 名诊断为自身免疫 Addison 病的患者的血清样本进行检测，其中 86（86%）例样本 21-OH Ab 为阳性。

**检测下限**

将本试剂盒的阴性对照检测 20 次，计算平均值和标准差，2 个标准差条件下的检测下限为 0.13u/mL，指数值为 12。

**批内精密度(n=25)**

样本	平均浓度 u/mL (n=25)	CV(%)	平均指数 (n=25)	CV(%)
1	0.30	2.7	39	2.2
2	0.89	6.1	92	4.8
3	2.0	6.3	154	3.5
4	5.4	18.1	249	7.3
5	55	9.9	512	2.3

**批间精密度(n=20)**

样本	平均浓度 u/mL (n=20)	CV(%)	平均指数 (n=20)	CV(%)
A	0.39	4.1	43	4.9
B	1.0	7.4	102	4.6
C	2.7	17.9	164	8.9
D	10.7	11.5	284	6.2
E	58.7	14.4	500	8.4

**临床准确性**

用本试剂盒对 185 例非 Addison 病的自身免疫疾病患者血清进行检测，结果显示下列物质的抗体对本试剂盒测定结果无影响，无干扰：甲状腺球蛋白，甲状腺过氧化物酶，双链 DNA，

TSH 受体, 谷氨酸脱羧酶, 锌转运体 8, 水通道蛋白 4, 电压门控钾通道, 乙酰胆碱受体。风湿因子。一例血清来自一名 1 型糖尿病患者(谷氨酸脱羧酶抗体阳性), 经测定其 21-OH Ab 浓度为 44u/mL, 此样本经 RSR 21-OH Ab RIA 试剂盒检测后呈阳性, 浓度为 100u/mL。一例样本来自 1 型糖尿病患者(锌转运体 8 抗体阳性), 21-OH Ab 浓度为 0.53u/mL。此样本经 RSR 21-OH Ab RIA 试剂盒检测后呈阴性。一例样本来自 AChRAb 抗体阳性患者, 测得值为 0.61u/mL。

### 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。请关注标签上注明的有效期和组份的保质期包括包被微孔板及稀释或复溶用试剂。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, 但仍应按照潜在的感染源予以应对。如存在污染, 在离开实验室之前应彻底洗手。

### 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



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



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。穿用防护衣。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

所有的试剂组分及样本在检测前需室温放置（20-25℃）。

第一天	加样	50μL 阴性和阳性质控品（B 和 C1-2），参照样本（D）或标准品（选用 E1-4）和患者血清，空白除外。
	加样	50μL 反应增强剂（F），空白除外。
	混匀	ELISA 振荡器上以 500 次/分振荡 1 分钟
	孵育	2-8℃下孵育过夜（16-20 小时），请勿振荡
第二天	洗板	洗板三次
	加样	每孔 100μL 21-OH 生物素（G）(使用回至室温的复溶液复溶)，空白除外。
	孵育	ELISA 振荡器上以 500 次/分，室温振荡 1 小时
	洗板	洗板三次
	加样	每孔 100μL 链霉亲和素-过氧化物酶（J）(按 1:20 稀释)，空白除外。
	孵育	ELISA 振荡器上以 500 次/分，室温振荡 20 分钟
	洗板	洗板三次
	加样	每孔 100μL TMB（L），包括空白孔。
	孵育	避光室温（20-25℃）放置 20 分钟，无需振荡
	加样	每孔 50μL 终止液（M），包括空白孔，振荡 5 秒
	20 分钟内，在 450nm 和 405nm 波长下读取每孔 OD 值	