

## 电压门控钾通道自身抗体放射免疫法（RIA）检测试剂盒使用说明书

### 预期用途

RSR 公司电压门控钾通道自身抗体放免法（VGKC Ab RIA）检测试剂盒专用于定量检测人血清中 P 型 VGKC 抗体（Ab），仅供专业技术人员操作使用。电压门控钾通道抗体可在周围神经系统中测得，通常认为本抗体与获得性神经性肌强直谱系疾病（NMT）以及痉挛-肌束震颤综合症（CFS）、以及中枢神经系统疾病如 Morvan 综合征、癫痫以及边缘叶脑炎（LE）有关。检测本抗体可辅助诊断自身免疫性离子通道病以及相关的神经系统障碍。本试剂盒具有较高的灵敏度和特异性，其易用性可有效帮助诊断疾病。

### 参考文献

I. Hart et al.

“Autoantibodies detected to expressed K<sup>+</sup> channels are implicated in Neuromyotonia.”

Ann Neurol 41 (1997), 238 - 246

A. Vincent et al.

“Potassium channel antibody-associated encephalopathy: a potentially immunotherapy-responsive form of limbic encephalitis.”

Brain 127 (2004), 701 - 712

K. Tan et al.

“Clinical spectrum of voltage-gated potassium channel autoimmunity.”  
Neurology 70 (2008), 1883 - 1890

### 检测原理

在 RSR VGKC Ab 放免法检测中，从兔脑提取的 VGKC<sub>s</sub> 经过表面活性剂增溶及 <sup>125</sup>I - α-树眼镜蛇毒素（可与 VGKC 的 Kv1.1、1.2、1.6 亚型结合）标记，形成 <sup>125</sup>I-VGKC（抗原）。患者血清及质控品中 VGKC Ab（抗体）与 <sup>125</sup>I-VGKC<sub>s</sub> 相结合，隔夜孵育后，抗原抗体复合物与抗人 IgG 抗体形成免疫沉淀。经过第二步 90 分钟的孵育后，加入缓冲液并离心。吸取上清液以除去未结合的标记蛋白。试管内剩余的放射量与样本抗体水平相对应，即自身抗体的浓度越高，免疫沉淀物的放射性就越强。

### 血清样本的储存和制备

待测血清应在分离后尽快进行测试或贮存，建议分装储存，2-8℃ 贮存最长两周，低于 -20℃ 储存可达更长时间。尽量避免反复冻融，防止储存温度过高。本试剂盒可使用血浆作为样本，但血浆中抗凝剂仅限枸橼酸、EDTA 以及肝素三种。每份样本需要 15 μL 完成单次测试。使用前在室温下解冻血清并轻轻混匀。使用稀释缓冲液 1:10 稀释血清（例如：15 μL 血清加 135 μL 稀释缓冲液）。检测前将稀释血清离心以除去血清中的颗粒物质（推荐速度：10-15,000g，离心 5 分钟）。

### IFU 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
	足量
	有效日期
	贮存
	阳性质控
	阴性质控

#### 需要但未提供的材料

4.5 mL锥型塑料试管(请勿使用玻璃制品)

50  $\mu$  L、0.75mL和 1mL微量加样器

稀释及复溶试剂量具

纯净水

旋涡混合器

低温离心机(可达1500xg)

$\gamma$  射线计数仪

#### 试剂盒组成

试剂盒及其组分请储藏于2-8℃

A	<sup>125</sup> I-VGKC 冻干粉状	~15KBq/瓶 (出厂状态)
	每瓶加入0.75mL纯净水复溶，用旋涡混合器轻轻混匀。 <b>复溶后立即使用</b>	
B	抗人IgG 2mL	直接使用
C	稀释缓冲液 60mL	

	直接使用，除使用时外应保存于2-8℃
<b>D</b>	<b>阴性质控品</b> 0.25mL 直接使用
<b>E</b>	<b>阳性质控品 I&amp;II</b> 2 X 0.25mL 直接使用，每瓶质控品浓度请查询瓶身标签

### 实验步骤

使用前所有试剂需在室温下(20-25℃)至少放置 30 分钟(稀释缓冲液(C)除外)。在步骤 2, 4, 6 和 9 中建议使用 Eppendorf 连续移液器。

1. 每支管中加入50 μL稀释好的患者血清(使用稀释缓冲液按1: 10稀释)、阴阳质控品(质控品均已稀释完毕，可直接使用)
2. 每支管中加入50 μL 刚刚复溶完毕的碘125标记VGKC (A)；另备两支空管，加入标记抗原用以测定总计数。
3. 使用漩涡混合器轻轻将每管混匀,用适当方式覆盖试管,2-8℃下隔夜(16-20h)孵育。
4. 每管中加入50 μL抗人IgG抗体(B)。
5. 使用漩涡混合器轻轻将每管混匀，用适当方式覆盖试管，室温孵育90分钟。
6. 每管中加入1mL冷藏的稀释缓冲液(C) (总计数管除外)，并用漩涡混合器混匀。
7. 在4摄氏度，1500 x g下离心20分钟。
8. 吸取或倒出上清液。
9. 每管中加入1mL洗液(C)并用漩涡混合器轻轻混匀，以洗涤沉淀。
10. 重复步骤7和8。
11. 使用 γ 射线计数器对每管计数60秒。

### 结果分析

每管沉淀物每分放射计数 (cpm) 代表VGKC抗体与<sup>125</sup>I-VGKC结合量；结果通常可以表示为pmol/L毒素结合。这些参数可参照下述方式进行计算(K值和A值可参考试剂盒的QC文档)：

1. 形成碘125-α-树眼镜蛇毒素-VGKC复合物之日时的放射性比度K (Ci/mmol)；
2. 标记复合物自标记之日起至试验当天的衰减度A；
3. 稀释前血清的使用量C；
4. 所用的gamma计数器的计数效率B；
5. 阳性质控品德cpm减去阴性质控品的cpm (D)。

计算公式如下：

$$\text{pmol/L} = \frac{1000 \times D \times A}{C \times K \times B \times 2.22}$$

举例（仅作示例，请勿用于实际结果计算）

	cpm	最终浓度 (pmol/L)
阴性质控品	2041	0
阳性质控品 I	10827	387
阳性质控品 II	4874	125

### 检测临界值

阴性结果	$\leq 72\text{pmol/L}$
阳性结果	$> 72\text{pmol/L}$

### 性能评价

#### 临床特异性

用本试剂盒对100名健康志愿者血清进行检测，98例(98%)均诊断为VGKC抗体阴性。

#### 临床灵敏性

用本试剂盒对30例疑似电压门控钾通道病和相关神经障碍的患者血清进行检测，27例(90%)均被诊断为VGKC抗体阳性。

#### 检测下限

检测试剂盒中阴性质控品20次，计算其结果平均值及标准差。本试剂盒在两倍标准差下的检测下限为 $4.5\text{pmol/L}$ 。

#### 批内精密度

样本	平均值 $\text{pmol/L}$ (n=20)	变异度CV (%)
1	102	5.7
2	150	5.8
3	332	3.7

#### 批间精密度

样本	平均值 $\text{pmol/L}$ (n=12)	变异度CV (%)
1	89	6.6
2	138	6.4
3	320	5.4

#### 临床准确性

未观察到以下物质的自身抗体对本检测的干扰：乙酰胆碱受体、21-羟化酶、谷氨酸脱羧酶、促甲状腺激素受体、甲状腺过氧化物酶、甲状腺球蛋白。17例1型糖尿病患者血清中有一例IA-2阳性患者在检测中发现VGKC抗体阳性；26例类风湿性关节炎患者中有2例检测为VGKC抗体阳性。

#### 干扰性

未观察到添加以下物质对本检测产生干扰： $500\text{mg/dL}$ 血红蛋白、 $20\text{mg/dL}$ 胆红素或 $3000\text{mg/dL}$ 脂肪乳剂。

#### 检测漂移

用本试剂盒进行检测可能会出现轻微的漂移，其中各步骤孵育时间是关键，同时其余的条件也应按说明书中要求，以保证最佳实验结果。

安全性

本试剂盒应由专业人员根据说明书进行操作。请关注标签上注明的有效期和复溶组份的稳定性。详细的安全信息参见材料安全数据清单。本试剂盒含有放射性成分。使用者应关注并遵循地方法规、规范，依法贮存、运输、处置放射性物品。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，并在条件允许下配用个人辐射计量仪。放射性材料应由经授权人员在指定地点使用。使用后应彻底洗手。在离开指定地点前应检查手部和衣物是否有沾染。

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，但仍应留意组分潜在的传染性风险。当污染发生时或离开实验室前，请彻底清洁手部。在处置包含受试样本在内的试验污染、废弃物前应确保进行无害化处理。

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，但这些物质也应按潜在感染源进行处置。

试剂盒中部分组分包括少量叠氮化钠作为防腐剂。在处理试剂盒组分时请用大量的水冲洗排水系统，避免形成重金属复合物。

简单实验步骤

使用前所有试剂组分需室温放置（20-25℃）至少 30 分钟	
加样：	50 μL 稀释的患者血清（用稀释缓冲液按 1:10 稀释）以及阴阳质控品（直接使用，无需稀释）。
加样：	50 μL <sup>125</sup> I- VGKC，另备两支空管加入标记抗原用作总计数管。
试管：	盖好试管，使用旋涡混合器轻轻混匀。
孵育：	2-8℃下隔夜（16-20h）
加样：	每管 50 μL 抗人 IgG 抗体
试管：	盖好试管，使用旋涡混合器轻轻混匀。
孵育：	室温下 90 分钟
加样：	每管加 1mL 冷藏的稀释缓冲液
试管：	使用旋涡混合器轻轻混匀
试管：	4℃下 1500 x g 离心 20 分钟
试管：	弃去上清液
加样：	每管加 1mL 冷藏的稀释缓冲液
试管：	使用旋涡混合器重新溶解沉淀
试管：	4℃下 1500 x g 离心 20 分钟
试管：	弃去上清液
使用 γ 射线计数仪对每管计数 60 秒	