

谷氨酸脱羧酶抗体（GADAb）检测试剂盒（酶联免疫法）说明书

【产品名称】

通用名称：谷氨酸脱羧酶抗体（GADAb）检测试剂盒（酶联免疫法）

英文名称：GADAb ELISA Kit

【包装规格】

96 测试 x 1

【预期用途】

谷氨酸脱羧酶抗体（GADAb）检测试剂盒（酶联免疫法），用于定量测定人血清中谷氨酸脱羧酶抗体（GADAb）的含量。

胰岛β细胞抗原的自身抗体是 1 型糖尿病（Type 1 Diabetes Mellitus）的重要血清学标志物。可被识别的胰岛β细胞抗原包括：胰岛素、谷氨酸脱羧酶（GAD）、胰岛素瘤抗原-2（IA-2）和锌转运体 8（ZnT8）等。

【检测原理】

本试剂盒应用酶联免疫法定量测定人血清中谷氨酸脱羧酶抗体（GADAb）水平。主要检测原理是依据 GADAb 的 Y 型结构在其两侧臂都具有抗原结合点，一侧同包被在微孔的固相抗原 GAD65 结合，另一侧同生物素化的液相抗原 GAD65 结合，从而形成桥式结构。随后加入的过氧化物酶标记的链霉亲和素与被固定在 GADAb 一侧的生物素结合。洗掉未结合的酶标记物后，添加底物 TMB 产生蓝色，添加终止液后反应终止显黄色。使用酶标仪在 405nm 和 450nm 波长下测定吸光度值（OD 值），计算样品浓度。较高的吸光值意味着被检测样本中存在 GADAb。检测范围：5~2000U/mL（NIBSC 97/500 浓度单位）。

【主要组成成分】

产品组成：微孔板，生物素标记的 GAD65 及其复溶缓冲液，酶标记物（SA-POD）及其稀释液，底物液（TMB），浓缩洗涤液，终止液，校准品，阳性质控品，阴性质控品。主要成分见下表。

组分名称	组分规格	主要成分
微孔板	96 孔	包被有 GAD65 的微孔板，每个孔板包含 12 条，每条 8 孔。
校准品	6 x 0.7mL	浓度分别为 5、18、35、120、250、2000U/mL（NIBSC 97/500 浓度单位）GADAb 阳性的人血清，开瓶即用。
阳性质控品	1 x 0.7mL	GADAb 阳性的人血清（浓度范围见瓶体标签），开瓶即用。
阴性质控品	1 x 0.7mL	GADAb 阴性的人血清，开瓶即用。
生物素标记的 GAD65	3 小瓶	生物素化的重组人 GAD65 冻干品，开瓶即用。
生物素标记的 GAD65 复溶缓冲液	2x15mL	磷酸盐缓冲液，开瓶即用。
酶标记物（SA-POD）	1 x 0.7mL	浓缩过氧化物酶标记的链霉亲和素。使用前，用其稀释液 1:20 稀释。
酶标记物稀释液	1 x 15mL	磷酸盐缓冲液，开瓶即用。
底物液（TMB）	1 x 15mL	四甲基联苯胺，开瓶即用。

浓缩洗涤液	1 x 125mL	浓缩 Tris 缓冲液。使用前，用纯水 10 倍稀释。
终止液	1 x 12mL	0.25mol/L 硫酸，开瓶即用。

检测需要但试剂盒未提供的材料

1. 能调剂 25 μ L 和 100 μ L 的移液器。
2. 能够定量复溶或稀释试剂体积的方法。
3. 纯水。
4. 具有 405nm 和 450nm 检测波长的酶标仪。
5. ELISA 孔板振动器（可达 500 次/分钟的非垂直振动器）。
6. ELISA 孔板盖。

【储存条件及有效期】

1. 未开封试剂盒置于 2~8 $^{\circ}$ C 可保存 12 个月（有效期详见试剂盒）。
2. 微孔板：包装开封后但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 $^{\circ}$ C~8 $^{\circ}$ C 最多可稳定保存 16 周。
3. 生物素标记的 GAD65：复溶后的生物素标记的 GAD65 在 2 $^{\circ}$ C~8 $^{\circ}$ C 最多可稳定保存 3 天。
4. 酶标记物：已稀释的酶标记物在 2 $^{\circ}$ C~8 $^{\circ}$ C 最多可稳定保存 16 周。
5. 洗涤液：已稀释的洗涤液在 2 $^{\circ}$ C~8 $^{\circ}$ C 可保存至试剂盒有效期。

【适用仪器】

酶标仪（含 405nm，450nm 波长）

【样本要求】

1. 待分析血清应该在经过分离后立即检测或储存（建议分装）于 -20 $^{\circ}$ C 或更低温度。单次检测仅需 50 μ L 样本血清（建议复孔检测，每孔 25 μ L）。
2. 避免重复冻融或储存温度升高。
3. 请勿使用脂血或溶血样本进行检测。
4. 请勿使用血浆进行检测。
5. 需要时，在室温下解冻待测血清样本并轻轻混合以确保均一性。
6. 检测前用离心机分离血清（建议用微型离心机转速在 10,000~15,000xg，离心 5 分钟），以去除微粒物质。如果血清浑浊或包含微粒，请勿省略此离心处理步骤。

【检验方法】

使用前使所有试剂在室温(20~25 $^{\circ}$ C)下搁置至少 30 分钟。建议在步骤 4、7、10、11 中使用 Eppendorf 连续加样器。

1.	加入 25 μ L 患者血清、校准品、阴性质控品和阳性质控品到各自孔中，一式两份。预留一个空白孔。（见步骤 12）。
2.	盖上孔板盖，室温条件下，在 ELISA 孔板振动器（500 次/分）上振荡 1 小时。
3.	用 ELISA 孔板洗涤器抽出试剂并用稀释后的浓缩洗涤液清洗孔板 3 次。如手工洗板，迅速倒扣孔板于适当托盘上以丢弃孔内液体。手工洗板三次并在清洁干燥的吸水表面上拍干孔板。
4.	用移液器加入 100 μ L 复溶的生物素化的 GAD65 于每个孔内（空白孔除外）。添加过程中避免液体飞溅到孔外。
5.	盖上孔板盖，室温条件下，在 ELISA 孔板振动器（500 次/分）上振荡 1 小时。
6.	重复清洗步骤 3。
7.	用移液器加入 100 μ L 稀释的酶标记物于每个孔中（空白孔除外）。

8.	盖上孔板盖，室温条件下，在 ELISA 孔板振荡器（500 次/分）上振荡 20 分钟。
9.	重复清洗步骤 3。如手工清洗，在拍干孔板前，额外用纯水清洗一次，以去除泡沫。
10	用移液器加入 100 μ L 底物液于每个孔内（包括空白孔），在室温条件下避光静止孵育 20 分钟。
11	用移液器加入 100 μ L 终止液于每个孔内（包括空白孔），盖上孔板盖，振动大约 5 秒钟。确保每个孔的反应同时终止。
12	在反应终止后五分钟内，用酶标仪分别在 450nm 和 405nm 波长下读取每个孔的吸光值，并扣除仅包含 100 μ L 底物液和 100 μ L 终止液的空白孔吸光值。

【质量控制】

1. 如阴性质控品与空白孔的 OD450 值之差在小于 0.1，则表明阴性质控品是在正确的范围内，使检测能够有效的进行。
2. 能够读取 2000U/mL 校准品的 OD405 值，并且通过乘以合适的系数可以转化为 OD450 值。如 2000U/mL 校准品与空白孔的 OD450 值之差大于 4.0，则表明检测性能良好。

【临界值】

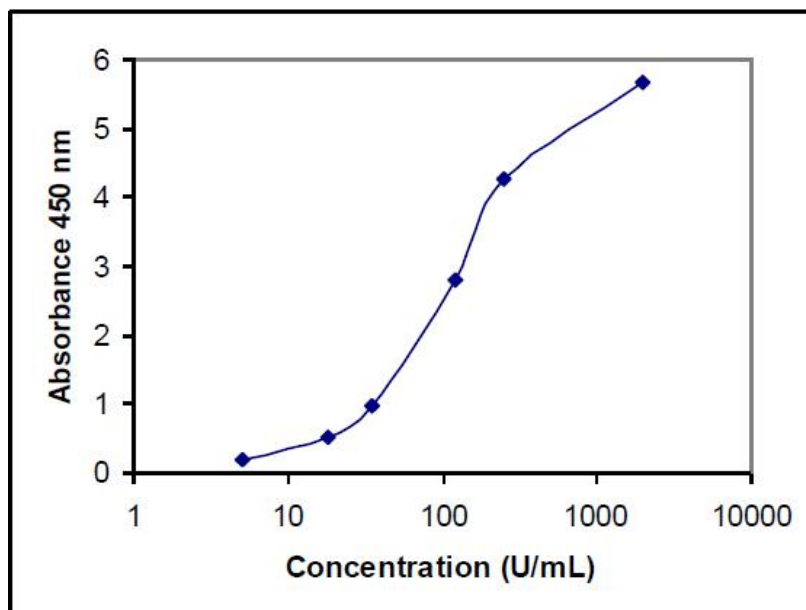
临界值	U/mL
阴性	<5U/mL
阳性	\geq 5U/mL

【检测结果分析】

以校准品浓度为 X 轴（对数模式）和以校准品的吸光度为 Y 轴（线性模式）建立标准曲线。RSR 绘成对数/线性 Spline 曲线，平滑系数为 0。根据标准曲线可以读出样本血清的 GADAb 浓度。亦可使用其他数据处理系统。可赋予阴性质控品浓度为 0.5U/mL 来辅助电脑分析检测结果。由于大多数测试血清的浓度会低于 250U/mL，所以可以省略 2000U/mL 校准品。抗体浓度高的样本可用 GADAb 阴性血清或试剂盒阴性质控品或 RSR 额外提供的稀释剂进行稀释。例如，20 μ L 样本加上 180 μ L 稀释剂得到 10 倍稀释液。其他稀释倍数（例如 100 倍）可以从 10 倍稀释液制备或视情况而定。参照试剂盒的校准品（按照 NIBSC 97/550 标准），某些血清的稀释不会呈线性变化。

典型结果（仅作为范例，勿用于实际结果计算）

校准品	OD450	浓度 (U/mL)	OD405	浓度 (U/mL)
B1	0.199	5	0.061	5
B2	0.527	18	0.164	18
B3	0.975	35	0.301	35
B4	2.794	120	0.843	120
B5	4.264	250	1.254	250
B6	5.671	2000	1.668	2000
阴性质控品	0.035	0	0.012	0
阳性质控品	1.374	49.2	0.418	49.6



【产品性能指标】

临床特异性和灵敏度

在 DASP2005 研究中，本试剂盒特异性为 98% (n=100)，灵敏度为 92% (n=50)。

最低检测限

检测试剂盒阴性质控品 20 次，计算平均值和标准差。在 2 倍标准差时检测下限是 0.57U/mL。

批间精密度

样本	U/mL (n=20)	CV (%)
A	97	5.7
B	2.1	5.2
C	2.7	6.4

批内精密度

样本	U/mL (n=25)	CV (%)
1	97	7.3
2	20	8.5
3	7.0	3.5

干扰样本对检测的影响

非 1 型糖尿病自身免疫疾病患者的血清分析表明甲状腺球蛋白或甲状腺过氧化物酶 (n=10) 或 TSH 受体 (n=20) 的自身抗体对此检测无干扰。在 dsDNA 阳性 (n=10) 和类风湿因子阳性 (n=30) 的样本中各有 1 份对 GADAb 呈阳性。

当样本加入以下材料时没有观察到干扰情况：血红蛋白 5mg/mL，胆红素 20mg/dL 或脂肪乳剂不高于 3000mg/dL。

【注意事项】

1. 本品仅供体外诊断使用，操作应严格按照说明书进行。
2. 所有试验需在 20~25°C 下进行，应避免由日光照射机器或周围仪器发热引起的高温。

3. 使用新的吸头用于阳性质控品、阴性质控品、校准品和待测样本的操作。
4. 不能混用其他制造商的产品。
5. 取出所需数量的微孔条，包装开封后但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，保存于 2~8°C。
6. 将酶反应物底物加入微孔后，酶标板需立即放置于黑暗处。
7. 操作前应仔细阅读本说明书并严格按照其指示操作，否则可能会导致错误的检测结果。
8. 废弃样本和废液的处理应遵照相应的生物安全和有毒有害物质管理规定。

【参考文献】

1. H. Brooking et al. A Sensitive non-isotopic assay for GAD65 autoantibodies, Clinica Chimica Acta 2003 331:55-59
2. S. Chen et al. Sensitive non-isotopic assays for autoantibodies to IA2 and to a combination of both IA2 and GAD65. Clinica Chimica Acta 2005 357:74-83
3. E. Nilson et al. Calcium addition to EDTA plasma eliminates falsely positive results in the RSR GADAb ELISA. Clinica Chimica Acta 388 (2008) 130-134
4. K. Rahmati et al. A Comparison of Serum and EDTA Plasma in the Measurement of Glutamic Acid Decarboxylase Autoantibodies (GADA) and Autoantibodies to Islet Antigen-2 (IA-2A) Using the RSR Radioimmunoassay (RIA) and Enzyme Linked Immunosorbent Assay (ELISA) Kits. Clin. Lab. 2008 54:227-235
5. C. Törn et al. Diabetes Antibody Standardization Program: evaluation of assays for autoantibodies to glutamic acid decarboxylase and islet antigen-2. Diabetologia 2008 51:846-852

【生产企业】

制造商名称：RSR Limited

生产地址及注册地址：Avenue Park, Pentwyn, Cardiff, CF23 8HE, United Kingdom

电话：+44 29 2073 2076

传真：+44 29 2073 2704

网址：www.rsrltd.com

售后服务机构名称：天津阿斯尔生物科技有限公司

售后服务机构地址：天津滨海高新区华苑产业区海泰发展六道 6 号海泰绿色产业基地 J 座 312 室

售后服务机构电话：+86 22 8372 6755

【医疗器械注册证书编号】国械注进20152401578

【产品标准编号】YZB/UK1593-2015

【说明书批准及修改日期】2015年4月9日