

犬乙酰胆碱受体自身抗体检测试剂盒(放射免疫法)

使用说明书

预期用途

RSR 公司生产的犬乙酰胆碱受体自身抗体检测试剂盒(放射免疫法)用于定量测定犬血清中的乙酰胆碱受体自身抗体(Canine Acetylcholine Receptor autoantibody, cAChR Ab), 需专业人员操作使用。犬血清中自身抗体与犬乙酰胆碱受体(Canine Acetylcholine Receptor, cAChR)的反应与神经肌肉接头处的神经肌肉间传导损伤相关联, 特别是与犬重症肌无力(MG)有关。抗体的测定在疾病诊断过程中具有重要价值。

参考文献

C.W Dewey et al

Clinical Forms of Acquired Myasthenia Gravis in Dogs: 25 Cases (1988-1995).

J. of Veterinary Internal Medicine (1997) 11: 50-57

G.D Shelton et al

Acquired Myasthenia Gravis. Selective Involvement of Esophageal, Pharyngeal and Facial Muscles.

J. of Veterinary Internal Medicine (1990) 4: 281-284

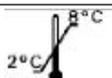
检测原理

本试剂盒依托重组犬乙酰胆碱受体(cAChR)复合物与碘 125 标记的 α -金环蛇毒素构建放射免疫检测法。在检测中, 碘 125 标记的 cAChR 与待测血清一同孵育, 产生的复合物与抗 IgG 抗体免疫共沉淀。自身抗体浓度越高, 沉淀的放射性物质越多。

待测样本要求及储存

待测血清样本应在分离后立即检测, 或者-20°C或更低的温度下分装保存。每份样本需 10 μ L 完成测定(以 5 μ L 双份检测计算)。请避免样本反复冻融。不正确地贮存血清样本可能导致抗体活性降低。测定前在室温下复融样本并轻轻混匀。避免使用脂血或溶血样本。样本中如存在颗粒物或性状浑浊请在检测前使用微量离心机于 10000g 下离心 5 分钟以去除任何颗粒物。如果血清浑浊或含有颗粒, 请不要省略此离心步骤。

标识

				
仅供科研使用	目录编号	参阅说明书	生产厂商	批号
				
足量	储存温度	有效期	阴性质控	阳性质控

实验所需但试剂盒未提供的材料

3.5mL 测定管, 使用沉淀增强剂时推荐使用圆底测定管

合适的管架

微量移液器, 可选加样量为 5 μ L, 25 μ L、50 μ L、750 μ L 和 1mL

漩涡混合器

1500g 冷冻离心机

适当的可移除测定管内液体的设备
γ射线计数仪

试剂的准备工作

将未开封的试剂盒和所有组分储存在 2 - 8°C。

A	碘 125 标记的犬 AChR 2 瓶, 冻干粉		20kBq/ 瓶 (出厂状态)
	每瓶用 0.75 mL 复溶缓冲液(B)进行复溶, 轻轻混合使其溶解。		立即使用
B	碘 125 标记的犬 AChR 复溶缓冲液	4mL	直接使用
C	阴性质控	0.1mL	直接使用
D	阳性质控 (浓度范围见标签)	0.1mL	直接使用
E	正常血清	1mL	直接使用
F	抗-IgG 抗体	1.5mL	直接使用
G	沉淀增强剂	1mL	直接使用
	使用前彻底混匀		
H	洗涤液 不使用时在 2-8°C下储存	70mL	直接使用

实验步骤

使用前, 除洗涤液外, 所有试剂应在室温(20 - 25°C)下放置至少 30 分钟。步骤 2、4、6、7 和 10 建议使用 Eppendorf 连续移液器。

1. 吸取阴性质控 (C), 阳性质控 (D) 和待测血清 (未稀释) 各 5 μ L 加入标记好的实验管内, 建议双管检测。
2. 吸取 50 μ L 新复溶的碘 125 标记的 cAChR (A+B) 加入每个管中, 并额外加入两个空管进行总计数。
3. 在漩涡混合器上轻轻混合每个管; 用合适盖子盖上管并在室温下 (20-25°C) 孵育两小时。
4. 吸取 50 μ L 抗-IgG 抗体 (F) 加入各管 (总计数管除外)。
5. 在漩涡混合器上轻轻混合每个管; 用合适盖子盖上管并在室温下 (20-25°C) 孵育两小时。
6. 吸取 25 μ L 沉淀增强剂加入各管 (总计数管除外)。
7. 吸取 1ml 冷 (2-8°C) 洗液 (H) 加入各管 (总计数管除外) 并使用漩涡混合器轻轻混匀。
8. 用冷冻离心机 2-8°C 下以 1500g 离心 20 分钟。
9. 吸出或弃去上清液。
10. 吸取 1mL 冷藏(2 - 8°C)洗涤液 (H) 加入每管 (总计数管除外), 用漩涡混合器轻轻旋起沉淀。
11. 重复步骤 8 和 9。
12. 使用 γ 计数仪对每个管(包括总计数管)碘 125 计数 2 分钟。

结果分析

测定管余下的沉淀中, 放射量代表标记受体所结合的抗体的含量。最终结果可使用以下公式转换为 nmol/L 受体结合量:

$$\text{nmol/L cAChR 结合量} = \frac{(\text{待测样本cpm值} - \text{阴性质控品cpm值}) \times A}{C \times K \times B \times 2.22}$$

其中：

A：碘 125 自生产日到检测日时的衰减因数

B：计数器效率

C：检测中使用血清量(即 5 μ L)

K：标记 AChR 时碘标记毒素的活度(Ci/mmol)

A、K 值详见每批试剂盒中随附表单。

典型结果

(仅作示例，不用于实际结果计算)

	cpm	nmol/L
阴性质控	1004	0.0
阳性质控	7688	4.1

检测临界值

阴性	< 1.0 nmol/L
阳性	\geq 1.0 nmol/L

此临界值已在 RSR 得到验证。但每个实验室应建立自己的正常和病理参考值范围的 cAChR-Ab 水平。此外，建议每个实验室在检测中包括自己的质控样本。

线性

犬乙酰胆碱受体抗体浓度与 cpm 值在一定范围内呈线性关系。为了克服这个问题，抗体阳性的血清可以用提供的正常血清(E)稀释若干倍后进行检测。抗体浓度可以在线性范围内使用结合数据计算。不同病犬血清的线性范围通常不同。

临床评价

临床特异性

用本试剂盒对 24 只健康犬的血清进行测定，23 例(96%)为 cAChR Ab 阴性。

临床灵敏度

用本试剂盒对 4 例诊断为重症肌无力犬的血清进行检测，4 例均为 cAChR Ab 阳性。

安全评估

沉淀增强剂



信号词：警告

危险说明

H373:长期或反复暴露可能对器官造成损害

预防说明

P260: 不要吸入灰尘/烟雾/气体/气雾/蒸汽/喷雾

P314: 若有不适，请立即就医

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。

简要实验步骤

使用前, 将所有试剂(除洗涤液(H)和样本在室温(20-25°C)下放置至少 30 分钟	
加样:	5 μ L 阴性质控 (C), 阳性质控 (D) 和待测样品 (所有试剂均未稀释)
加样:	50 μ L 碘 125 标记的 cAChR (A) (使用 B 立即复溶后) 加入每个管中, 并额外再加入两个空管用于计总数。
混合:	在漩涡混合器上轻轻混合并盖上管
孵育:	室温下两小时
加样:	50 μ L 抗-IgG Ab (F) 加入到所有管中 (两个总计数管除外)
混合:	在漩涡混合器上轻轻混合并盖上管
孵育:	室温下两小时
加样:	25 μ L 沉淀增强剂 (G) 加入各管 (两个总计数管除外)
加样:	1mL 冷 (2-8°C) 洗液 (H) 加入各管 (两个总计数管除外)
混合:	在漩涡混合器上轻轻混合
离心:	在 1500g 下离心 20 分钟 (2-8°C)
吸取:	抽吸或弃去上清液
加样:	1mL 冷 (2-8°C) 洗液 (H) 加入各管 (两总计数管除外)
混合:	在漩涡混合器上混合管以使沉淀重新悬浮
离心:	使用冷冻离心机 2-8°C 下以 1500g 离心 20 分钟
吸取:	抽吸或弃去上清液
使用 γ 射线计数器对每管计数 2 分钟	

仅供科研使用

厂家: RSR Limited

地址: Parc Ty Glas, Llanishen, Cardiff CF14 5DU United Kingdom

电话: +44 29 2068 9299 传真: +44 29 2075 7770

邮件: info@rsrltd.com 网址: www.rsrltd.com

代理人: 天津阿斯尔生物科技有限公司

地址: 天津市滨海高新区华苑产业区海泰绿色产业基地 J 座 312 室

网址: www.rsren.com 电话: 022-83726755 邮箱: sales@rsrcn.com