



## 产品说明书

产品编码 8049

2017 年 4 月 24 日

# 肌肉特异性受体酪氨酸激酶自身抗体检测试剂盒 (间接免疫荧光法) (Anti-MuSK IFA)

- 60 个测试

IVD 体外诊断试剂盒

间接免疫荧光试验测定人血清中抗肌肉特异性受体酪氨酸激酶 (MuSK) 的抗体

REF	产品编码	LOT	批号
	参阅随附文件		制造商
	温度限制		使用者
	操作说明书		生物风险

## 预期用途

肌肉特异性受体酪氨酸激酶自身抗体检测试剂盒 (间接免疫荧光法) (下称本试剂盒) 是用于定性和半定量测量人血清中针对 MuSK 抗原抗体的试剂盒。对于已经用 MuSK 抗原转染的这种 HEP-2 细胞。

重症肌无力(MG)是一类神经系统疾病,其特点是神经和肌肉之间的信号传输受到干扰。它是一种自身免疫性疾病,由针对运动终板横纹肌的自身抗体引起。这种疾病的特征是骨骼肌的负荷依赖性减弱,一般在一天中增加,并经历恢复阶段。造成 MG 的原因是针对突触后膜结构的抗体,该结构位于神经肌肉终板区域。在绝大多数情况下 (~85%), 乙酰胆碱受体抗体是可检测的。在 1-10% 的病例中,可以检测到针对肌肉特异性酪氨酸激酶 (MuSK) 的抗体,并且在一些受影响的人中可以看到所谓的低亲和力乙酰胆碱受体抗体,或抗脂蛋白受体相关蛋白 (LRP4) 的抗体。有一部分患者虽可能患有重症肌无力,但可能检测不到抗体 (血清阴性重症肌无力) (1)。

## 测试原理

本试剂盒运用间接免疫荧光法来定性和半定量测定抗 MuSK 抗体。其中上层涂有 HEP-2 MuSK 细胞 (转染率 40%), 下层有未转染的 HEP-2 细胞。为了排除非特异性反应,在 HEP-2 MuSK 细胞和未转染的 HEP-2 细胞上平行测试每个样品。



稀释的患者样品和对照中的抗体在第一步中特异性地与固定在载玻片上的 HEP-2 MuSK 细胞中的 MuSK 抗原反应。在室温下反应 30 分钟后,洗涤除去未结合的组分。

在第二步反应中,结合的抗体与生物素偶联的抗人抗体 (IgG 和轻链特异性) 特异性反应。在室温下反应 30 分钟后,通过进一步的洗涤步骤将过量的结合物分子与结合到固定相的免疫复合物分离。


第三步反应需使用与荧光分子偶联的链霉抗生物素蛋白检测生物素偶联的抗人抗体。在室温下反应 30 分钟后,通过洗涤将过量的链霉抗生物素蛋白 - 荧光染料分子与结合到固定相的免疫复合物分离。

覆盖后,使用荧光显微镜 (激发波长 490nm, 发射波长 520nm) 读取载玻片。

## 病人标本

### 标本收集和储存

通过静脉穿刺取血。离心凝固后分离血清。不应使用血脂、溶血和受污染的样品。标本在 2-8°C 可保存 3 天,长期保存需



**GA GENERIC ASSAYS GmbH**

**Ludwig-Erhard-Ring 3**

**15827 Dahlewitz, Germany**

---

Telephone: +49 (0) 33708-9286-0  
Fax: +49 (0) 33708-9286-50

[www.genericassays.com](http://www.genericassays.com)

放置在-20℃环境。避免反复冻融。如果样本要用作很多试验使用，等分样品后在-20℃环境保存。

血脂样品可能会产生覆盖细胞底物的膜，不应该使用。应避免使用受污染的样品，因为它们可能含有可消化细胞底物的蛋白水解酶。

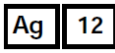





#### 使用前的准备





样品在用于抗 MuSK IFA 测定之前，需将样品放至室温。注意轻轻搅动血清样品，以确保均匀性。

**筛选：**患者样品用 PBS-BSA 缓冲液 (B + C) 1:20 (v/v) 稀释，例如，**10 μl 样品+190 μl PBS-BSA (B + C) 缓冲液**

**测定：**将 1:20 (v/v) 稀释的样品用 PBS-BSA (B + C) 进一步稀释 2 倍。**100 μl 稀释样品+100 μl PBS-BSA (B + C)**，进行以下滴定：1: 20, 1: 40, 1: 80, 1: 160 等。

### 60 个测试的各种组分

<b>A (8041)</b> 	<b>滑板</b> 用 HEp-2 MuSK 细胞包被 6 个孔，且用 HEp-2 细胞包被 6 个孔	10 内含真空密封干燥剂；
<b>B (8210)</b> 	<b>BSA</b> 适用于 2 x 1000 ml 溶液	2×10g 干物质
<b>C (9018)</b> 	<b>PBS 稀释液</b> 适用于 2 x 1000 ml 溶液	2×10g 干物质
<b>D1 (8042)</b> 	<b>结合物 1</b> 抗人 IgG (重链和轻链特异性)，生物素标记	2 x 2.5 ml 准备好使用滴管 黄色瓶盖
<b>D2 (8048)</b> 	<b>结合物 2</b> 链霉抗生物素蛋白-FITC 标记	2 x 2.5 ml 准备好使用滴管 蓝色瓶盖
<b>E (8008)</b> 	<b>封固剂</b> 甘油溶液，磷酸盐缓冲液，pH 7.4±0.2	3.0ml 准备好使用滴管 白色瓶盖
<b>F (8046)</b> 	<b>印迹模板</b>	10

<b>P (8043)</b> 	<b>阳性对照</b> 标签上的规格  (稀释的人血清)	0.5ml 准备好使用滴管 红色瓶盖
<b>N (8047)</b> 	<b>阴性对照</b> (稀释的人血清) 	0.5ml 准备好使用滴管 绿色瓶盖

#### 额外需要的工具 and 材料

- 可调微量移液管 (10,100,1000 μl)
- 一次性枪头
- 样品稀释管
- 蒸馏水 (或去离子水)
- pH 计
- 1L 量筒或量杯
- 潮湿的房间
- 塑料挤压洗瓶
- Coplin 染色缸或染色皿
- 盖玻片 24 x 60 毫米
- 荧光显微镜，激发波长 490 nm，发射波长 520 nm，物镜 10 倍 (推荐)

#### 尺寸和储存

每个试剂盒都含有足以进行 60 次测定 (10x6) 的试剂。完整试剂盒的失效日期可在包装盒外面的标签上找到。在某些情况下，单个试剂的失效日期可能会超过此值，并显示在相应的试剂上。使用前，所有 HEp-2 MuSK 试剂需储存在 2-8° C 环境下。干物质 PBS 可以在室温下储存。试剂盒打开后，所有试剂盒组分若在 2-8℃ 条件下稳定保存，则可保存至少 2 个月。

#### 使用前的准备

打开包装之前载玻片需放至室温。

为了配制 PBS-BSA 溶液 (B + C)，将干燥物质 PBS (10g) 和 BSA (10g) 倒入烧杯或量筒 (1000ml) 中，用蒸馏水或去离子水 (**推荐蒸馏水**) 填充至刻度。通过搅拌或摇动充分溶解干燥物质。溶解的溶液的 pH 值必须为 7.4±0.2 (必要时进行调整)。得到的 PBS-BSA (B + C) 缓冲溶液可以在室温下储存在密封的玻璃容器中。混浊、污染溶液或 pH 值发生变化的溶液应丢弃。

保护结合物免受光照。

## 实验流程

- 根据需要稀释患者样本（筛选，滴定）
- 处理过程中不要让载玻片变干

1	将所有测试试剂置于室温（20-25° C），在使用前立即从包装中取出载玻片并贴上标签。
2	移取 25 $\mu$ l PBS-BSA 溶液（B + C）至每个孔。不要用移液管尖端接触孔的表面。
3	将载玻片在室温条件下在潮湿室中反应 10 分钟。
4	通过敲打吸水纸去除多余的 PBS-BSA（B + C）
5	涂 1 滴（25-30 $\mu$ l）对照样品（P, N），并将 25 $\mu$ l 稀释的患者血清移液至转染细胞的一个孔（上层）和未转染细胞的一个孔（下层）。不要用移液管尖端接触孔的表面。
6	将载玻片在室温条件下在潮湿室中反应 30 分钟。
7	使用挤压瓶，用 PBS-BSA（B + C）溶液冲洗载玻片，而不得将冲洗流直接聚焦在孔上。为避免交叉污染，不允许液体流过其他孔。要使用 12 孔滑块实现此目的，请沿着滑块中心冲洗，首先是一行，然后是另一行。
8	在 Coplin 染色缸或染色皿中用新鲜的 PBS-BSA(B + C) 溶液洗涤 3 $\times$ 3 分钟，在开始时和每次更换时轻轻搅拌容器。
9	单独取下载玻片，轻拍吸水纸以除去过量的 PBS-BSA（B + C），并用印迹模板（F）小心地在孔周围干燥。每孔加 1 滴（25-30 $\mu$ l）结合物 1（D1），确保表面完全被覆盖。
10	将载玻片在室温条件下在潮湿室中反应 30 分钟。
11	按照第 7 步和第 8 步所述洗涤载玻片。
12	单独取下载玻片，轻拍吸水纸以除去过量的 PBS-BSA（B + C），并用印迹模板（F）小心地在孔周围干燥。向每个孔中施加 1 滴（25-30 $\mu$ l）结合物 2（D2），确保表面完全被覆盖。
13	将载玻片在室温条件下在潮湿室中反应 10 分钟。避免直射光线。
14	按照第 7 步和第 8 步所述洗涤载玻片。
15	单独取下载玻片，轻拍吸水纸以除去过量的 PBS-BSA（B + C），并用印迹模板（F）小心地在孔周围干燥。在载玻片的每个孔中施加 1 滴封固剂（E）。小心地将盖玻片放在载玻片上，使得封固剂形成连续的层，且没有气泡。从载玻片底部擦去多余的封固剂。
16	在荧光显微镜下读取载玻片。

如果无法立即读取载玻片，可将它们在 2-8° C 下储存几天。为了长期保存，用指甲油密封盖玻片的边缘，并将载玻片存放在 -20° C。

## 阅读/解释结果

### 荧光强度

荧光强度分类如下：

3+ = 明亮的黄绿色荧光

2+ = 透明，但无光泽，黄绿色荧光

1+ = 非常弱，抑制荧光

### 阳性结果

如果 Hep-2 MuSK 细胞的细胞膜上荧光强度在 1+ 或者 1+ 以上，则样品稀释度为阳性，则可见细胞整个细胞质的荧光染色(图 1)。此外，未转染的 Hep-2 细胞必须没有荧光染色。

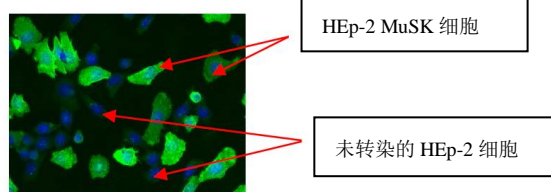


图 1: 针对 HEp-2 MuSK 细胞上的 MuSK 的抗体（绿色），用 DAPI（蓝色）（40x 物镜）对细胞核进行复染色。

图 2 显示了一个重症肌无力患者和一个健康献血者的血清在 HEp-2 MuSK 细胞和 HEp-2 细胞上的图像。从患者血清的荧光图中可以清晰的看到 HEp-2 MuSK 细胞表面有清晰的荧光。观察到并非所有细胞都携带 MuSK 抗原。相反，患者血清未显示未转染细胞的荧光。血液供体血清在任一细胞类型上均未显示或仅显示非常弱的荧光。

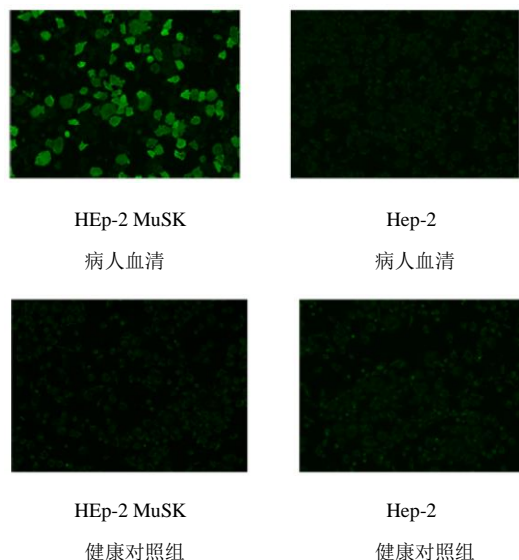


图 2: 在 HEp-2 MuSK（载玻片的上层）和未转染的 HEp-2 细胞（载玻片的下排）（10x 物镜）上的一个 MuSK 抗体阳性和一个阴性血清的实例图像。

荧光强度不代表抗体浓度，并且没有临床相关性。各种显微镜之间的光学，滤光器和光源的差异可能导致荧光强度中不止一个分类阶段的差异。

### 阴性结果

如果 HEp-2 MuSK 细胞显示荧光强度小于 1+ 并且没有可检测的模式，则样品稀释度为阴性。

除了 MuSK 抗原（例如 ANA, AMA）之外，还有针对 HEp-2 细胞其他成分的抗体存在，它们在转染细胞和未转染细胞上均产生荧光。这些图像不表示存在 MuSK 抗体。

### 滴定法

通过半定量滴定，得到的结果为 1+ 荧光检测的最后稀释步骤。滴度是稀释的倒数。

1:20 = 3+

1:40 = 2+

1:80 = +

1:160 = - 滴度是 80。

### 参考值

Anti-MuSK IFA	滴度
阴性	<20
阳性	≥ 20

由于人群之间的差异，建议每个实验室建立自己的抗 MuSK 抗体水平的正常和病理参考范围。上面给出的值仅供参考。

### 试验验证

每次试验必须包含阳性和阴性对照。试剂盒中包含的对照品

必须显示以下结果：

**阴性对照：** 荧光强度小于 1+

**阳性对照：** 具有荧光强度 2+ 的 HEp-2 MuSK 细胞的阳性染色。

如果对照未显示预期结果，则试验结果无效，必须重复试验。

确保实验过程完全按照说明书操作（正确制备试剂，反应时间和温度，仔细清洗）。如果重复试验未达到验证标准，请联系您的供应商。可根据要求提供故障排除信息表。

### 方法的局限性

不应仅基于体外诊断方法的结果进行临床诊断。临床医生应考虑所有临床和实验室检查结果，来进行判断。

滴定终点的确定取决于使用物镜放大率的荧光显微镜的类型和条件，以及观察者的主观判断。

被细菌污染的样品或洗涤缓冲液可导致细胞底物的非特异性染色。

### 实验数据的特征点

我们的研究中新型重组细胞检测的相对敏感性和特异性

（MuSK 抗体阳性患者= 38; AChR 抗体阳性患者= 46, 健康对照= 60）与 MuSK ELISA 分别为 95% 和 99.1%。

## 反应流程

### 肌肉特异性受体酪氨酸激酶自身抗体检测试剂盒（8049）

根据要求稀释患者样本：

用 PBS-BSA (B + C) 溶液筛选稀释/滴定稀释液

1	将所有试验试剂和载玻片置于室温 (20-25° C)		
2	移取 25 μl PBS-BSA 溶液 (B + C) 至所有孔		
3	反应 10 分钟, 室温 (20-25° C)		
4	轻敲吸水纸		
		对照	患者样本
5	移液管 对照 P, N	1 滴(25 – 30 μl)	
	预稀释的血清	25 μl	
6	反应 30 分钟, 室温 (20-25° C)		
7	用 PBS-BSA (B + C) 溶液洗涤		
8	清洗 在新鲜的 PBS-BSA (B + C) 溶液中 3×3 分钟		
9	加入结合物 1 (D1)	1 滴(25 – 30 μl)	1 滴(25 – 30 μl)
10	反应 30 分钟, 室温 (20-25° C)		
11	用 PBS-BSA (B + C) 溶液洗涤		
12	清洗 在新鲜的 PBS-BSA (B + C) 溶液中 3×3 分钟		
13	加入结合物 2 (D2)	1 滴(25 – 30 μl)	1 滴(25 – 30 μl)
14	反应 10 分钟, 室温 (20-25° C)		
15	用 PBS-BSA (B + C) 溶液洗涤		
16	清洗 在新鲜的 PBS-BSA (B + C) 溶液中 3×3 分钟		
17	封固 每孔 1 滴封固剂 (E), 小心地盖上盖玻片		
18	使用荧光显微镜读取		

### 安全须知

- 此试剂盒仅限 *体外诊断* 使用。只能由经过培训的实验室人员进行操作。严格按照说明操作。必须在规定的有效期之前使用完试剂盒及其各自的试剂。
- 混合来自不同批次的组分或使用来自其他制造商的试剂可导致结果发生改变。
- 一些试剂含有少量叠氮化钠 (<0.1%) 作为防腐剂。不要吞咽试剂，避免接触粘膜。
- 打开的试剂在下次使用前应在温度为 2-8° C 的条件下储存。
- 此试剂盒中来源于人类的原材料中，HBsAg (乙型肝炎表面抗原) 以及针对 HIV (人类免疫缺陷病毒) 和 HCV (丙型肝炎病毒) 抗体检测结果为阴性。然而，已知的检测不能确保这些病毒的存在与否，因此，操作所有组份和病人样本时要按照存在潜在危险进行。
- 在处理检测试剂盒，患者样品和对照品时，必须遵守所有健康和安全管理规定，以及处理潜在传染性物质和危险化学品的规定。应遵循以下规定：
  - 在操作该试剂盒时，禁止吸烟、饮水、饮食
  - 佩戴防护手套以防止接触试剂和血清
  - 禁止用嘴吸取任何材料
  - 遵守各个试剂的安全警告
- 我们建议实验室使用内部质控血清进行自己的质量保证 (参见德国联邦法律公报 I, 第 1657 页的规定，以及德国医学协会的建议, Dt.Ärzteblatt98, 第 42 期, 第 A2747 页 - 59,2001)。

## 参考文献

- (1) N. E. Gilhus: Myasthenia and the neuromuscular junction. In: Current opinion in neurology. Volume 25, Number 5, October 2012, S. 523-529