کیت الایزا برای تعیین غلظت هورمون تیروکسین آزاد انسانی

(۹۶ تستی)

Human Free Thyroxine (FT4) ELISA Kit

مقدمه :

استفاده روش سنجش ایمونولوژیکی آنزیمی (EIA) امکان تعیین مقدار کمی بسیار از هورمون ها را در مایعات بدن فراهم می آورد. این روش از صحت، حساسیت، تکرارپذیری، سرعت و اختصاصی بودن کافی برخوردار است. این روش سنجش ایمونولوژیکی امکان اندازه گیری غلظت بسیار کم هورمون تیروکسین آزاد را در حجم کمی از سرم (۵۰ میکرولیتر در هر اندازه گیری) برآورده می سازد.

هورمون های تیروکسین (T4) و تری یدوتیرونین (T3) عمدتا به پروتئین های خاصی در سرم متصل می شوند، که بعنوان حامل این هورمون ها در جریان خون عمل می کنند. دو پروتئین عمده عبارتند از Thyroxine Binding Globulin (TBG) و آلبومین. درصد بسیار کمی از این هورمون ها بصورت آزاد در جریان خون وجود دارند که این قسمت عامل فعالیت های بیولوژیکی این هورمون ها می باشد. مقدار تیروکسین آزاد مستقل از اتصال پروتئینی است، در واقع غلظت fT4 حالت واقعی کارکرد تیروئید را نشان می دهد.

اساس روش اندازه گیری :

کیت الایزای FT4 موجود بر اساس سنجش ایمونولوژیکی آنزیمی رقابتی تهیه شده است. در این کیت از روش پوشش آنتی بادی استفاده شده است. T4 آزاد موجود در نمونه ها برای اتصال به آنتی بادی منوکلونال موشی ضد T4 پوشش داده شده برروی چاهک ها با T4 متصل به آنزیم HRP (HRP-T4) رقابت می کند. پس از زمان انکوباسیون، چاهک ها تخلیه شده و شستشو داده می شوند. سپس به هر چاهک سوبسترای آنزیم اضافه می شود که فعالیت آنزیم بطور معکوس با غلظت T4 آزاد در نمونه ها متناسب است. استانداردهای T4 آزاد با غلظت مشخص، همراه با نمونه های مجهول آزمایش می شوند که بر اساس منحنی استاندارد جذب نور در مقابل غلظت T4 آزاد، غلظت نمونه های مجهول بدست می آید.

معرف ها

۱- میکروپلیت پوشش داده شده: شامل ۹۶ چاهک جداشدنی که با آنتی بادی منوکلونال موشی ضد T4 پوشش داده شده اند.

۲- کونژوگه آنزیمی (HRP-FT4) : یک ویال ۱۲ میلی لیتری آماده مصرف.

۳- استانداردها : ۶ ویال یک میلی لیتری از استاندارد با غلظت های FT4 ۰، ۰/۵، ۱/۰، ۲/۰، ۴/۰ و ۶/۰ نانوگرم در دسی لیتر (ng/dl) که در سرم نرمال انسانی تهیه شده و از تیومرسال بعنوان نگهدارنده استفاده شده است.

۴- سرم کنترل: یک ویال یک میلی لیتری آماده مصرف.

۵- محلول شستشو دهنده غلیظ (20X) : یک ویال ۲۵ میلی لیتری محلول شستشو که برای تهیه محلول شستشوی آماده مصرف لازم است این محلول به نسبت ۱/۲۰ با آب دیونیزه رقیق شود.

۶- محلول رنگ زا: یک ویال ۱۲ میلی لیتری محلول آماده مصرف

۷- محلول متوقف کننده واکنش: یک ویال ۱۲ میلی لیتری اسیدسولفوریک یک نرمال.

مواد و وسایل مورد نیاز که در کیت موجود نیست

۱- سمپلرهای ۵۰ و ۱۰۰ میکرولیتری دقیق

۲- آب دیونیزه

۳- دستگاه الایزا ریدر دارای فیلتر ۴۵۰ نانومتری و در صورت امکان ۶۳۰ نانومتری بعنوان فیلتر رفرانس.

۴- کاغذ جاذب رطوبت

نکات قابل توجه برای مصرف کنندگان

۱- در این کیت از سرم انسانی استفاده شده است که از نظر HbsAg و HIV منفی بوده اند.

۲-از تماس محلول متوقف کننده واکنش ($1N\ H_2SO_4$) خودداری کنید. در صورت تماس، با آب فراوان آنرا بشوئید.

۳-از استفاده از مواد پس از تاریخ انقضاء خودداری کنید و از مخلوط کردن یا استفاده از کیت ها با شماره بچ مختلف پرهیز نمائید.

۴- درب ظروف را پس از استفاده ببندید و از تعویض درب ها جدا خودداری کنید.

۵- محلول های محتوی مواد افزودنی یا نگهدارنده مثل سدیم آزاید نباید در واکنش آنزیمی وارد شوند.

تهیه و جمع آوری نمونه

۱- آزمایش را باید بر روی نمونه های سرمی انجام داد. نمونه های شدیدا همولیزه و دارای چربی باید حذف شوند.

۲- نمونه ها را می توان برای دو روز در دمای ۲ تا ۸ درجه سانتیگراد و برای زمان های طولانی تر (تا سی روز) در دمای ۲۰- درجه سانتیگراد نگهداری نمود.

۳- از انجماد و ذوب مکرر نمونه ها باید خودداری کرد.

آماده سازی معرف ها

۱- کلیه معرف ها را به دمای اتاق برسانید. قبل از استفاده آنها را به آرامی تکان سر و ته نمایید.

۲- برای تهیه محلول شستشوی آماده مصرف، یک حجم از بافر شستشو غلیظ (20X) را با ۱۹ حجم آب دیونیزه رقیق نمائید.

روش انجام آزمایش

۱- تعداد چاهک های کوت شده برای استانداردها، سرم کنترل و نمونه های بیمار را بصورت ۲ تایی انتخاب کنید و مابقی چاهک ها را همراه ماده آبگیر درون کیسه مخصوص قرار داده و درب آنرا ببندید.

۲- ۵۰ میکرولیتر از استانداردها، سرم کنترل و نمونه های بیمار را به داخل هر چاهک بریزید.

۳- ۱۰۰ میکرولیتر از کونژوگه آنزیمی (HRP-FT4) را به تمام چاهک ها اضافه کنید.

۴- پلیت را بمدت ۶۰ – ۳۰ ثانیه به آرامی تکان دهید تا محتویات چاهک ها خوب مخلوط شوند. سپس درب چاهک ها را با برچسب مخصوص پلیت پوشانده، آنرا بمدت یک ساعت در درجه حرارت اتاق (۲۸ – ۲۲ درجه سانتیگراد) و تاریکی انکوبه کنید.

۵- محتویات چاهک ها را خالی کرده و چاهک ها را ۵ بار با ۳۰۰ میکرولیتر بافر شستشوی آماده مصرف بشوئید. برای شستشوی چاهک ها، ابتدا ۳۰۰ میکرولیتر بافر شستشو را داخل چاهک بریزید، سپس چاهک ها را وارونه کرده و همراه با تکان د ادن خالی کنید و در انتهای شستشو، با ضربات ملایم بر روی کاغذ جاذب تمامی مایع موجود در چاهک ها را تخلیه نمائید.

۶- ۱۰۰ میکرولیتر از سوبسترای آماده مصرف به تمامی چاهک ها اضافه کنید و آنها را بمدت ۱۵ دقیقه در دمای اتاق و تاریکی انکوبه نمائید.
۷- ۱۰۰ میکرولیتر از محلول متوقف کننده واکنش به همه چاهک ها اضافه کنید. سپس جذب نور هر چاهک را در طول موج ۴۵۰ نانومتر با دستگاه الایزا ریدر قرائت نمائید (در صورت امکان از طول ۶۳۰ نانومتر بعنوان فیلتر رفرانس استفاده کنید). سنجش جذب نوری باید حداکثر تا ۳۰ دقیقه پس از اتمام آزمایش انجام شود.

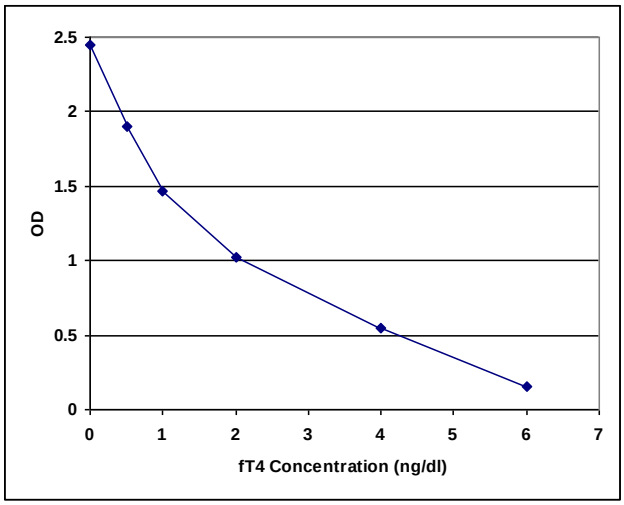
محاسبه نتایج

۱- با استفاده از میانگین جذب نوری استانداردها (محور Y) و غلظت مشخص آنها (محور X) برروی کاغذ میلی متری، منحنی استانداردی رسم کنید.
۲- میانگین جذب نوری برای هر نمونه را بدست آورده و روی محور Y جای آنرا پیدا کنید. سپس نقطه مذکور را توسط خطی به منحنی وصل کنید. از نقطه بدست آمده خطی عمود بر محور X وارد کنید تا نقطه تلاقی که نشان دهنده غلظت نمونه است، بدست آید.

راهنمای محاسبه

مقادیر جذب نوری ارائه شده در جدول ذیل تنها بعنوان راهنمایی آورده شده است و هر آزمایشگاهی باید برای هر بار آزمایش یک منحنی استاندارد جدید بدست آورد.

ردیف	مقدار استاندارد(ng/dl)	جذب
1	0	2.45
2	0.5	1.90
3	1.0	1.47
4	2.0	1.02
5	4.0	0.55
6	6.0	0.15



مقادیر طبیعی

بدلیل اختلافات سنی، نژادی و رژیم تغذیه، نمی توان برای تمام جمعیت ها محدوده مرجع تعیین کرد. بنابراین هر آزمایشگاه باید محدوده مرجع خود را گزارش نماید. مقادیر طبیعی در سرم افراد نرمال که توسط آزمایشات مکرر به روش الایزا بدست آمده است به قرار زیر می باشد:

محدوده طبیعی 0.80– 2.0 ng/dl

برای تبدیل به واحدSI به شرح ذیل می توان عمل کرد:

ng/dl × 12.9 = pmol/L

خصوصیات کیت

۱– حساسیت

با رقیق سازی متوالی استاندارد ۰/۵ با سرم صفر، حساسیت این کیت برای تعیین مقدار هورمون FT4 برابر ۰/۲ ng/dl بدست آمد.

۲– دقت

برای محاسبه میزان دقت در یک روز و روزهای مختلف، آزمایش بر روی ۳ نمونه سرم ۲۰ بار تکرار شد که ضریب تغییرات به شرح ذیل است.

ضریب تغییرات در روز

نمونه سرم	دفعات تکرار	میانگین (ng/dl)	انحراف معیار	ضریب تغییرات (%CV)
1	20	0.86	0.06	6.9
2	20	1.2	0.07	6.2
3	20	2.2	0.11	4.9

ضریب تغییرات در روزهای مختلف

نمونه سرم	دفعات تکرار	میانگین (ng/dl)	انحراف معیار	ضریب تغییرات (%CV)
1	10	1.16	0.08	7.1
2	10	1.52	0.06	3.7
3	10	3.28	0.13	3.9

۳– ویژگی

از مواد زیر برای بررسی میزان تداخل این کیت استفاده شد.

نوع ماده	غلظت (ng/dl)	درصد تداخل
لووتیروکسین		100
لیوتیرونین	2.5	0.33
دی یدوتیرونین	1.4	0.24
سدیم سالی سیلات	10	0.34

۴– خطی بودن

سه نمونه مختلف سرمی با استاندارد صفر به نسبت های ۱:۲، ۱:۴ و ۱:۸ رقیق شدند. سپس غلظت FT4 در آنها با استفاده از کیت محاسبه شد که نتایج ذیل بدست آمد.

نمونه سرمی	غلظت اولیه (ng/dl)	درصد بازیابی		
		1:2	1:4	1:8
1	1.27	109	110	107
2	2.04	98	102	108
3	3.54	101	105	104