

کیت الایزا برای تعیین غلظت نام هورمون تیروکسین انسانی

Human Total Thyroxine (T4) ELISA Kit

مقدمه

استفاده روش سنجش ایمنولوژیکی 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 ایمنولوژیکی آنزیمی امکان اندازه گیری غلظت بسیار کم هورمون تیروکسین (T4) در حجم کمی از سرم (۲۵ میکرولیتر در هر اندازه گیری) برآورده می سازد.

تیروکسین (T4) و تری یدوتیرونین (T3) از غده تیروئید ترشح می شوند و از طریق یک سیستم فیدبک حساس بین هیپوتالاموس و هیپوفیز تنظیم می شوند. هیپوتالاموس با آزادسازی هورمون آزاد کننده تیروتروپین (TRH) باعث تحریک غده هیپوفیز برای ترشح هورمون محرک تیروئید (TSH) می شود. اثر این هورمون باعث می شود تا غده تیروئید T3 و T4 را آزاد نماید. این هورمون ها به نوبه خود باعث تنظیم آزادسازی TRH و TSH از طریق مکانیسم کنترلی فیدبک می شوند. در موقع لزوم، این هورمون ها بداخل جریان خون آزاد می شوند. این هورمون ها عمدتاً 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. هر گونه اختلال در غدد تیروئید، هیپوفیز و هیپوتالاموس ممکن است غلظت این هورمون ها را در جریان خون تغییر دهد.

اساس روش اندازه گیری

کیت الایزا T4 موجود بر اساس سنجش ایمنولوژیکی آنزیمی رقابتی تهیه شده است. T4 موجود در نمونه ها برای اتصال به آنتی بادی پلی کلونال خرگوشی ضد T4 پوشش داده شده (coated) بر روی چاهک ها با T4 متصل به آنزیم Horseradish Peroxidase (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 در نمونه ها متناسب است. استانداردهای T4 با غلظت مشخص، همراه با نمونه های مجهول آزمایش می شوند که بر اساس منحنی استاندارد جذب نور در مقابل غلظت T4، غلظت نمونه های مجهول بدست می آید.

معرف ها

- ۱- میکروپلیت پوشش داده شده: شامل ۹۶ چاهک جداشدنی که با آنتی بادی ضد T4 تهیه شده در خرگوش پوشش داده شده اند.
- ۲- کونژوگ آنزیمی (HRP-T4): یک ویال ۱۲ میلی لیتری آماده مصرف.
- ۳- استانداردها: ۶ ویال یک میلی لیتری از استاندارد با غلظت های T4 ۰، ۲۰، ۵۰، ۱۰۰، ۱۵۰ و ۲۵۰ نانوگرم در میلی لیتر (ng/ml) 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 ۵۰ 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 ۲۵ 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 H₂SO₄) 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 با 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 شدیداً 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 دهید.
- 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 و نمونه های بیمار را بصورت ۲ تایی انتخاب کنید و مابقی چاهک ها را همراه ماده آنگیر درون کیسه مخصوص قرار داده و درب آنرا ببندید.
- ۲- ۲۵ میکرولیتر از استانداردها، سرم کنترل و نمونه های بیمار را به داخل هر چاهک بریزید.
- ۳- ۱۰۰ میکرولیتر از کونژوگ آنزیمی (HRP-T4) 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 ۳۷ درجه سانتیگراد و تاریکی انکوبه کنید.

خصوصیات کیت

۱- حساسیت

با رقیق سازی متوالی استاندارد ۲۰ با سرم صفر، حساسیت این کیت برای تعیین مقدار هورمون T4 برابر ۱۰ ng/ml 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/ml)	انحراف معیار	ضریب تغییرات (CV)
1	20	65.5	3.5	5.4
2	20	60.2	2.5	4.2
3	20	55.3	2.1	3.8

ضریب تغییرات در روزهای مختلف

نمونه سرم	دفعات تکرار	میانگین (ng/ml)	انحراف معیار	ضریب تغییرات (CV)
1	10	49.5	3.0	6.1
2	10	50.2	2.7	5.4
3	10	61.2	3.0	4.9

۳- ویژگی

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

نوع ماده	غلظت (ng/ml)	درصد تداخل
لووتیروکسین	۱۰	۰/۵۳
لیوتیرونین	۱۵۰	۰/۳۳
دی یدوتیرونین	۱۰۰۰	۰/۲۹

۴- خطی بودن

سه نمونه مختلف سرمی با استاندارد صفر به نسبت های ۱:۲، ۱:۴ و ۱:۸ رقیق شدند. سپس غلظت T4 در آنها با استفاده از کیت محاسبه شد که نتایج ذیل بدست آمد.

نمونه سرمی	غلظت اولیه	درصد بازیابی		
۱	۱۵۵/۴	۱:۲	۱:۴	۱:۸
۲	۱۴۷/۶	۱۰۳	۹۸/۶	۹۷/۵
۳	۱۶۰/۵	۹۷/۵	۹۶/۵	۹۸/۶

منابع

1. Agharanya JC. Clinical usefulness of ELISA technique in the assessment of thyroid function. West Afr J Med 1990;9(4):258-63.
2. American College of Physicians. Screening for thyroid disease. Ann Intern Med 1998; 129: 141-3.
3. Helfand M, Redfern CC. Screening for thyroid disease: an update. Ann Intern Med 1998; 129:144-58.
4. Karir T, Samuel G, Sivaprasad N, Meera V. Development of coated tubes RIA for serum T3 for production scale. J. Immunoassay & Immunochemistry 2005, 26, 77-87.

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 دادن 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 سوپسترای آماده مصرف به تمامی چاهک ها اضافه کنید و آنها را بمدت ۲۰ 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

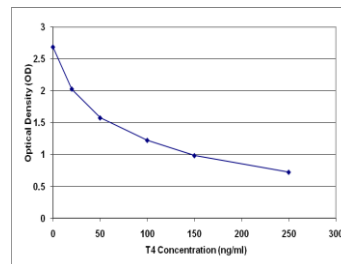
۱- با استفاده از میانگین جذب نوری استانداردها (محور Y) و غلظت مشخص آنها (محور X) برروی کاغذ میلی متری، منحنی استاندارد رسم کنید.

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/ml)	جذب
1	0	2.68
2	20	2.02
3	50	1.57
4	100	1.22
5	150	0.98
6	250	0.72



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 ۱۲۶ - ۴۵ ng/ml

برای تبدیل واحدها به شرح ذیل می توان عمل کرد:

$$\text{ng/ml} \times 0.1 = \mu\text{g/dl}$$

$$\text{ng/ml} \times 100 = \text{ng/dl}$$

$$\text{ng/ml} \times 1.289 = \text{nmol/L}$$

$$\text{nmol/L} \times 0.776 = \text{ng/ml}$$