کیت سنجش T- uptake به روش الایزا

مقدمه :

غده تیروئید تحت تنظیم هورمون تیروتروپین ، هورمونهای T3 و T4 را ترشح می کند ، این هورمونها بصورت آزاد در گردش خون به مقدار ناچیزی وجود داشته و مقدار اعظم آنها بصورت باند با پروتئینهای حامل وجود دارند ، سه پروتئین با تمایل و ظرفیتهای متفاوت برای T3 و T4 شناخته شده اندکه عبارتند از TBG که ۷۵ – ۶۵ درصد از ظرفیت حمل هورمونهای تیروئیدی را به عهده دارد ، TBPA (Thyroxine binding pre-albumin) که ۲۵– ۱۵ درصد از ظرفیت حمل هورمونهای تیروئیدی را به عهده دارد ، و آلبومین که کمترین تمایل به هورمونهای تیروئیدی را داشته ولی ظرفیت بالایی را دارا می باشد و ۱۰ درصد از هورمون تیروکسین و ۳۰ درصد از هورمون T3 در دسترس را حمل می کند. از آنجائیکه پروسه متابولیسم کاملاً توسط فرم آزاد هورمونهای تیروئیدی تنظیم می گردد واین مقدار هورمونهای آزاد وابستگی کاملی با میزان ظرفیت پروتئینهای حامل آنها دارد، اندازه گیری میزان این پروتئینها اهمیت می یابد. تا کنون جهت اندازه گیری ظرفیت پروتئینهای حامل هورمونهای تیروئیدی از روشهای متعددی شامل روش: Silicates , Ion-exchange و Denatured albumin استفاده شده است و یکی از جدیدترین و ساده ترین روشها روش EIA (Enzyme Immunoassay) بوده که دارای حساسیت مناسبی نیز می باشد .

اساس آزمایش :

اساس این آزمایش بر روش سنجش رقابتی استوار است به این ترتیب که چاهکهای پلیت با آنتی بادی ضد T4 پوشانده شده اند و در هنگام انجام آزمایش هورمون T4 به همراه T4 کنژوگه شده با آنزیم HRP و سرم به چاهکها اضافه میشوند. در این هنگام پروتئینهای حامل هورمونهای تیروئیدی بر حسب ظرفیت خود مقداری از هورمون T4 را جذب می نمایند ، ولی نمیتوانند با هورمون T4 کنژوگه واکنشی نشان دهند در نتیجه مقداری از T4 که جذب پروتئینهای حامل نگردیده است بر سر اتصال به آنتی بادیهای کف چاهک با هورمون T4 کونژوگه رقابت می نماید ، بنابراین هر چه ظرفیت حمل پروتئینهای سرم بالاتر باشد مقدار T4 کمتری برای رقابت با T4 کنژوگه باقی مانده و در رقابت با آن در اتصال به آنتی بادیهای کف چاهکها نا موفق تر خواهد بود (و بالعکس) ، پس از شستشو محلول سوبسترا به چاهکها اضافه میگردد که هر چه میزان رنگ زایی بیشتر باشد بیانگر بالاتر بودن میزان اتصال هورمون T4 کونژوگه بوده و این خود به این معنی است که مقدار T4 برداشت شده توسط پروتئینهای حامل بالا بوده بنابراین مقدار کمتری T4 برای رقابت باقی مانده است (و بالعکس) ، برای جلوگیری از فعالیت بیش از اندازه و نامناسب آنزیم ، محلول متوقف کننده افزوده می گردد که فعالیت آنزیم را مختل کرده و رنگ آبی را به زرد تبدیل می نماید که بهترین جذب نوری را در طول موج ۴۵۰ نانومتر دارد .

محتویات کیت :

۱) یک پلیت ۹۶ خانه حاوی چاهکهای پوشش داده شده با آنتی بادی ضد T4 (Anti-T4 Coated Plate) .
۲) محلول آنزیم کنژوگه (Enzyme Conjugate) : یک ویال حاوی ۶ میلی لیتر (آماده مصرف) .
۳) اسی بافر (Assay buffer) : یک ویال حاوی ۶ میلی لیتر (آماده مصرف) .
۴) سری استانداردها (Standards Set) : ۴ ویال استاندارد شامل غلظتهای تقریبی ۱۵ ،۲۶/۵ ، ۳۵/۵ و ۴۶ درصد .غلظت دقیق هر استاندارد بر روی ویال استانداردها درج گردیده است (هر ویال حاوی ۰/۵ میلی لیتر می باشد) .
۵) سرم کنترل : یک ویال حاوی ۰/۵ میلی لیتر سرم کنترل با غلظت مشخص درج شده بر روی برچسب ویال .
۶) محلول شستشو (Wash Solution) : یک ویال حاوی ۵۰ میلی لیتر محلول شستشوی غلیظ (X ۲۰) . جهت تهیه محلول شستشوی آماده مصرف مقدار لازم از محلول شستشوی غلیظ را به نسبت ۱/۲۰ با آب مقطر رقیق کنید .
۷) محلول رنگزای یک مرحله ای (Chromogen-Substrate) : یک ویال حاوی ۱۲ میلی لیتر (آماده مصرف) .
۸) محلول متوقف کننده (Stop Solution) : یک ویال حاوی ۱۲ میلی لیتر اسید کلریدریک ۱ نرمال .
۹) برچسب مخصوص پلیت .

مواد و وسایل مورد نیاز که در کیت موجود نمی باشند :

۱) دستگاه الایزاریدر دارای فیلتر ۴۵۰ نانومتر (در صورت امکان ۶۳۰ نانومتر به عنوان فیلتر رفرانس) .
۲) سمپلر های ۲۵ ، ۵۰ و ۱۰۰میکرو لیتر دقیق .
۳) آب مقطر .

نکات قابل ذکر برای مصرف کنندگان :

۱) محتویات این کیت فقط برای مصرف در همین کیت می باشد .

تهران، شهرک گلستان، بلوار گلها، خیابان یاس سوم، نبش خیابان یاسمن، پلاک ۱، کد پستی ۱۴۹۴۷۳۴۴۶۳
تلفن ۴۲۱۹۷۰۰۰ فکس ۴۲۱۹۷۰۰۷
300071402 www.pishtazteb.com info@pishtazteb.com sms
ویرایش پنجم – تیر ۱۳۹۳

۲) از مخلوط کردن محتویات کیتها با شماره ساختهای مختلف جداً خودداری نمایید .
۳) کلیه مواد موجود در کیت که منشاء سرمی دارند از نظر وجود HBsAg و آنتی بادی های ضد HCV و HIV کنترل گردیده اند و فاقد این عوامل می باشند ، جهت احتیاط بهتر است هر آزمایشگری که با کیت کار می کند از تماس مستقیم با مواد بپرهیزد .

شرایط نگهداری :

۱) کیت را در یخچال بین دمای ۲ تا ۸ درجه سانتی گراد نگهداری نمایید .
۲) چاهکها را در کیسه مخصوص پلیت همراه با نمگیر نگهداری نمایید .
۳) پایداری محتویات کیت تا پایان مدت انقضای نوشته شده بر روی هر یک از آنها می باشد .
۴) محلول شستشوی آماده مصرف که به نسبت ۱/۲۰ با آب مقطر رقیق شده باشد به مدت یک هفته در شرایط ۸-۲ درجه سانتی گراد قابل نگهداری و مصرف می باشد .

جمع آوری و آماده سازی نمونه :

سرم یا پلاسما را می توان پس از جدا نمودن از خون استفاده نمود ، نمونه را می توان برای مدت دو روز در دمای ۲ تا ۸ درجه سانتی گراد نگهداری کرد ولی برای نگهداری بیش از مدت دو روز باید از دمای ۲۰- درجه سانتی گراد استفاده گردد .

توضیحات عمومی :

۱) قبل از شروع مراحل آزمایش تمام مواد و نمونه ها را به درجه حرارت اتاق برسانید .
۲) بهتر است به محض شروع آزمایش کلیه مراحل بدون توقف انجام پذیرند .
۳) از نوک سمپلر یک بار مصرف برای هر نمونه استفاده کنید .
۴) پس از افزودن محلول متوقف کننده جذب نوری چاهکها حداکثر تا نیم ساعت قابل قرائت می باشد .
۵) برای کسب نتایج مطلوب باید شستشوی چاهکها بصورت کامل صورت گرفته و آخرین قطرات پس از شستشو از چاهکها تخلیه شود .
۶) در هنگام سمپلینگ ، تمام محلولها و نمونه ها را در وسط چاهکها بریزید .
۷) از مهمترین فاکتورها در حصول نتیجه مطلوب ، زمان انکوباسیون مناسب می باشد ، بنابراین پیشنهاد می گردد قبل از شروع آزمایش تمام مواد و محلولهای مورد نیاز را آماده نموده و درب محلولهای مورد نیاز را باز کنید ، این عمل با کاهش فاصله زمانی بین مراحل سمپلینگ باعث نتایج دقیقتر می شود .
۸) به دلیل مشابه در بند ۷ بهتر است که حجم انجام تست محدود باشد و زمان ریختن نمونه ها بیش از ۵ دقیقه بطول نیانجامد .

مراحل انجام آزمایش :

۱) تعداد چاهکهای مورد نظر را انتخاب نموده و باقی چاهکها را به همراه نمگیر درون کیسه مخصوص نگهداری پلیت قرار داده و درب آن را ببندید.
۲) ۲۵ میکرولیتر از هر استاندارد ، سرم کنترل و نمونه را به داخل هر چاهک بریزید ، پیشنهاد می گردد که از استانداردها و نمونه ها بصورت داپلیکیت استفاده شود بدین معنی که هر استاندارد و نمونه را در دو چاهک بریزید و در انتها از میانگین جذب نوری آنها برای محاسبه نتایج استفاده کنید ، سپس ۵۰ میکرولیتر اسی بافر (Assay Buffer) و در پی آن ۵۰ میکرولیتر آنزیم کنژوگه را در داخل چاهک ها ریخته و برای مدت ۱۵ ثانیه پلیت را تکان دهید تا محتویات چاهکها خوب مخلوط شوند و آنگاه درب چاهکها را با برچسب مخصوص پلیت پوشانده و چاهکها را به مدت یک ساعت در درجه حرارت اتاق (۲۸- ۲۲ درجه سانتی گراد) انکوبه نمایید .
۳) چاهکها را ۵ بار با محلول شستشوی آماده مصرف بشویید (برای شستشو می توان از سمپلر ۸ کاناله استفاده نمود ولی باید مواظب بود که محلول شستشو از یک چاهک به چاهک دیگر وارد نشود زیرا می تواند موجب ایجاد خطا در نتیجه آزمایش گردد ، در هر دفعه شستشو حدود ۳۰۰ میکرولیتر محلول شستشو در هر چاهک ریخته و سپس چاهک ها را با وارونه کردن و تکاندن خالی نمائید و در انتهای عملیات شستشو چاهکها را در حالت وارونه و با ضربات ملایم بر روی یک پارچه یا کاغذ نمگیر بکوبید تا قطرات اضافی خارج شوند) .
۴) ۱۰۰ میکرولیتر محلول رنگزا (Chromogen substrate) به هر چاهک اضافه نمایید و چاهکها را به مدت ۱۵ دقیقه در درجه حرارت اتاق و در تاریکی انکوبه نمایید .
۵) با اضافه کردن ۱۰۰ میکرولیتر محلول متوقف کننده (Stop solution) به هر چاهک ادامه واکنشهای آنزیمی را متوقف نمایید . برای سنجش جذب نوری هر چاهک از دستگاه الایزاریدر با فیلتر ۴۵۰ nm استفاده نمایید . (توصیه میشود از فیلتر ۶۳۰ nm به عنوان فیلتر رفرانس استفاده گردد) .

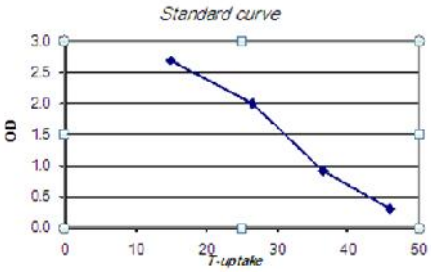
محاسبه نتایج:

از هر دستگاه الایزاریدر با قابلیت سنجش جذب نوری در طول موج ۴۵۰ nm میتوان استفاده نمود .

تهران، شهرک گلستان، بلوار گلها، خیابان یاس سوم، نبش خیابان یاسمن، پلاک ۱، کد پستی ۱۴۹۴۷۳۴۴۶۳
تلفن ۴۲۱۹۷۰۰۰ فکس ۴۲۱۹۷۰۰۷
300071402 www.pishtazteb.com info@pishtazteb.com sms
ویرایش پنجم – تیر ۱۳۹۳

۱) جذب نوری استانداردها و نمونه ها را به کمک دستگاه الایزاریدر در طول موج ۴۵۰ nm (و در صورت امکان در مقابل فیلتر رفرانس ۶۳۰ nm) بخوانید .
۲) با استفاده از میانگین جذب نوری استانداردها و غلظت معلوم آنها نموداری (Point to point) رسم کنید به این صورت که جذب نوری استانداردها را روی محور عمودی (Y) و غلظت آنها را روی محور افقی (X) برده و نقطه تلاقی غلظت و جذب نوری را برای هر استاندارد بدست آورید ، سپس نقاط بدست آمده را به یکدیگر وصل نمایید تا منحنی بدست آید .
۳) میانگین جذب نوری برای هر نمونه را بدست آورده و روی محور عمودی جای آن راپیدا کنید ، سپس نقطه مذکور را توسط خطی به منحنی وصل نمائید بطوریکه این خط بر محور عمودی کاملاً عمود باشد و بعد از محل تلاقی خط و منحنی، خطی عمود بر محور افقی وارد کنید نقطه تلاقی این خط با محور افقی مقدار غلظت را نشان خواهد داد.

جذب نوری	استانداردها %
۲/۷۰	۱۵
۲/۰	۲۶/۵
۰/۹۱	۳۵/۵
۰/۳۰	۴۶



توجه : جذبهای نوری و منحنی مربوطه فقط به عنوان نمونه می باشد و هر آزمایشگاه در هر دفعه انجام آزمایش باید منحنی جدیدی رسم نماید .

مقادیر مورد انتظار :

مقادیر نرمال T-uptake در سرم افراد طبیعی که توسط تستهای مکرر به روش الایزا بدست آمده به قرار زیر می باشد ولی پیشنهاد می گردد که هر آزمایشگاه مقادیر نرمال خود را بدست آورد :

محدوده طبیعی %	میانگین محدوده طبیعی %
۲۵ – ۳۵	۳۰

شاخصهای اجرایی :

۱) دقت آزمایش :

آزمایشهای اینترا- اسی (همخوانی غلظت مشخص از یک نمونه در یک بار آزمایش) و اینتر- اسی (همخوانی غلظت مشخص از یک نمونه درچندین بارآزمایشهای مختلف) با استفاده از ۳ سرم با غلظتهای مختلف T-Uptake انجام گردید که در جداول ۱ و ۲ آمده است .

جدول شماره ۱ (اینترا- اسی) :

نمونه	تعداد دفعات تکرار تست	میانگین ٪	SD	CV%
۱	۲۴	۲۲	۰/۵۹	۲/۷
۲	۲۴	۳۵/۴	۰/۸۴	۲/۴
۳	۲۴	۴۵/۳	۰/۷۰	۱/۵

جدول شماره ۲ (اینتر- اسی) :

نمونه	تعداد دفعات تکرار تست	میانگین ٪	SD	CV%
۱	۱۰	۱۷/۲	۰/۶۰	۳/۵
۲	۱۰	۲۷/۲	۱/۰۷	۳/۹
۳	۱۰	۳۶	۱/۰۵	۲/۹

هر سری آزمایش به صورت Duplicate انجام شده است .

تهران، شهرک گلستان، بلوار گلها، خیابان یاس سوم، نبش خیابان یاسمن، پلاک ۱، کد پستی ۱۴۹۴۷۳۴۴۶۳
تلفن ۴۲۱۹۷۰۰۰ فکس ۴۲۱۹۷۰۰۷
300071402 www.pishtazteb.com info@pishtazteb.com sms
ویرایش پنجم – تیر ۱۳۹۳

References:

Inada, M., and Sterling, K., Clin. Invest(1967),46,1442.
Murphy,B.,1968, Radioisotopes in Medicine, U.S.Atomic Energy Commission, Technical Information Center, Tennessee.
Hollander, C.S. and Shenkman, L., 1974, Methods of Hormone Radioimmunnassay, Academic Press,New York.
Hamolsky, M.W., Stein, M. and Freedberg, S.A.,J.Clin. Endocrionol.(1957),17,33.
Hebert, V., U. S. Patent Office #3(1971), 422, 819.
Mitchell, M. L., Harden, A. B. and O Rouke, M. E., J. Clin. Endocrionol., (1960) 20, 1474.
Rolleri, E., Buzzigoli, G., and Plassio, C., J. Nucl. Med. (1972)., 13, 892.
Nusynowitz, M. L., and Ealiszewski, Am. J. Clin. Pathol. (1971)., 56. 523.
Clark, F. and Horn, D. B., J. Clin. Endocrionol (1965). Metab., 25, 93.
Young. D. S., Pestaner, L. C. and Gilberman, U., Clinical Chemistry (1975), 21, 3660.

روش انجام آزمایش T-uptake بصورت شماتیک

چاهکهای کوت شده با آنتی بادی جهت تست T- uptake			
محلولها	استانداردها	سرم کنترل	نمونه
استانداردها	۲۵ میکرولیتر	–	–
سرم کنترل	–	۲۵ میکرولیتر	–
نمونه	–	–	۲۵ میکرولیتر
اسی بافر	۵۰ میکرولیتر	۵۰ میکرولیتر	۵۰ میکرولیتر
آنزیم کنژوگه	۵۰ میکرولیتر	۵۰ میکرولیتر	۵۰ میکرولیتر
پلیت را به ملایمت برای مدت ۱۵ ثانیه تکان دهید تا محتویات چاهکها بخوبی مخلوط شوند و سپس دهانه چاهکها را با برچسب مخصوص پلیت بپوشانید . ۶۰ دقیقه در دمای اتاق انکوبه کنید. برچسب پلیت را برداشته و محتویات چاهکها را خالی کنید. طبق دستور شستشو ۵ بار چاهکها را بشویید .			
محلول رنگزا	۱۰۰ میکرولیتر	۱۰۰ میکرولیتر	۱۰۰ میکرولیتر
۱۵ دقیقه در دمای اتاق و در تاریکی انکوبه کنید .			
محلول متوقف کننده	۱۰۰ میکرولیتر	۱۰۰ میکرولیتر	۱۰۰ میکرولیتر
جذب نوری چاهکها را در طول موج ۴۵۰ نانومتر(و در صورت امکان ۶۳۰ نانومتر به عنوان فیلتر رفرانس)قرائت کنید .			

تهران، شهرک گلستان، بلوار گلها، خیابان یاس سوم، نبش خیابان یاسمن، پلاک ۱، کد پستی ۱٤۹٤۷۳٤٤٦۳
تلفن ٤۲۱۹۷۰۰۰ فکس ٤۲۱۹۷۰۰۷
300071402 www.pishtazteb.com info@pishtazteb.com sms