

## کیت اندازه‌گیری (AFP) Alpha-Fetoprotein

### در سرم انسان

AFP ELISA Kit 96t Cat. No: 1124-96  
Brochure Rev: 19 (1398/03/20)

#### مقدمه:

(AFP) گلیکوپروتئینی با وزن مولکولی تقریبی ۷۰۰۰۰ دالتون است. AFP معمولاً در دوران جنینی و تکامل نوزادی توسط کبد، کیسه تخم و در غلظت‌های کمتر توسط دستگاه گوارش ساخته می‌شود. غلظت AFP در سرم در هفته دوازدهم حاملگی به بیشترین مقدار خود (تا ۱۰ mg/ml) می‌رسد. سپس به تدریج کاهش می‌یابد و تا یک سال پس از تولد به کمتر از ۲۵ ng/ml می‌رسد. مقادیر افزایش یافته AFP در بیماری‌هایی نظیر هپاتومای اولیه و تومورهای سلول‌های کیسه زرده مشاهده می‌شود. AFP یک تومورمارکر مهم جهت تشخیص و پیگیری درمان کارسینومای هپاتوسلولار می‌باشد. سطح این پروتئین در سرم خانم‌های باردار نیز افزایش می‌یابد ولی مقادیر بالای غیر طبیعی آن در خانم‌های باردار، به عنوان یک ریسک فاکتور برای سندرم داون در نظر گرفته می‌شود.

#### اصول آزمایش:

در این تست، بی‌حرکت سازی و اتصال کمپلکس ایمنی به سطح چاهک‌های به کمک واکنش بین استرپتاویدین (Streptavidin) کویت شده در سطح پلیت و آنتی‌بادی مونوکلونال ضد AFP بیوتینیل شده صورت می‌گیرد. پس از مخلوط شدن آنتی‌بادی مونوکلونال بیوتینیل شده، آنتی‌بادی متصل به آنزیم و سرم حاوی آنتی‌ژن، واکنش بین آنتی‌ژن و آنتی‌بادی‌ها بدون هیچ رقابتی

صورت می‌گیرد و کمپلکس‌های ساندویچ مخلوط تشکیل می‌شوند.

به موازات واکنش فوق، کمپلکس‌های ایمنی، به دلیل تمایل بسیار بالای بین استرپتاویدین و بیوتین به سطح پلیت متصل می‌شود. پس از به تعادل رسیدن واکنش، آنتی‌بادی‌ها و آنتی‌ژن‌های متصل نشده با آسپیره کردن تخلیه می‌شوند. پس از شستشوی چاهک‌ها، سوبسترای آنزیم HRP (مخلوط رنگزا) درون آنها ریخته می‌شود و محصول آبی رنگی ایجاد می‌شود. پس از اضافه کردن مخلوط متوقف کننده، رنگ زرد پدیدار می‌شود که در طول موج ۴۵۰ نانومتر بیشترین میزان جذب را دارد. شدت رنگ ایجاد شده و در نتیجه مقدار جذب با غلظت AFP سرم ارتباط مستقیم دارد. در نهایت غلظت AFP سرم به کمک منحنی استاندارد (نمودار کالیبراتورها) محاسبه می‌گردد.

#### محتویات کیت:

۱. میکرو پلیت Coat شده با استرپتاویدین ۹۶ تستی بسته‌بندی شده در کیسه آلومینیومی همراه با رطوبت گیر.
۲. کالیبراتورهای AFP در مقادیر ۰، ۵، ۲۵، ۵۰، ۲۵۰ و ۵۰۰ ng/ml تهیه شده در سرم انسان.
۳. کونژوگ AFP: ۱ و ۱۱ میلی‌لیتری که حاوی آنتی‌بادی‌های متصل به بیوتین و متصل به آنزیم HRP در بافر است.
۴. مخلوط شستشو (۵۰x): ۱ و ۲۰ میلی‌لیتری.
۵. مخلوط رنگزا A: ۱ و ۶/۵ میلی‌لیتری.
۶. مخلوط رنگزا B: ۱ و ۶/۵ میلی‌لیتری.
۷. مخلوط متوقف کننده واکنش: ۱ و ۱۲ میلی‌لیتری.
۸. مخلوط کنترل: ۱ و ۱/۵ میلی‌لیتری.
۹. بر حسب مخصوص پلیت: ۱ ورق.

توجه: کلیه محلول‌ها در دمای ۲ تا ۸ درجه سانتی‌گراد نگهداری شوند. مخلوط متوقف کننده در دمای اتاق نیز قابل نگهداری است.

#### احتیاط در استفاده از کیت:

۱. محتویات این کیت برای استفاده در همین کیت تعبیه گردیده لذا از استفاده مشترک با سایر کیت‌ها و یا شماره‌های ساخت دیگر جدا خودداری نمایید.
  ۲. کلیه محلول‌ها تا زمان انقضاء کیت پایدار هستند. از محلول‌هایی که تاریخ انقضاء آنها گذشته است، استفاده ننمایید.
  ۳. توجه فرمایید محلول‌ها در مجاورت نور و گرما قرار نگیرند.
  ۴. محتویات کیت منبع انسانی دارد. مواد مورد استفاده در این کیت از نظر منفی بود HIV1/2، HBsAg و HCV تست شده‌اند. ولی هیچ روشی به طور کامل قادر به مشخص کردن منفی بودن موارد فوق نیست. بنابراین لازم است به صورت بالقوه آلوده در نظر گرفته شود و کار با آنها طبق دستورالعمل‌های ایمنی انجام شود.
  ۵. استفاده از دستکش و عینک در هنگام کار الزامی است و در هنگام کار با کیت دقت فرمائید که محتویات به صورت یا سایر نقاط بدن نپاشد و از تماس با دهان و سایر مخاط جدا خودداری گردد.
- #### جمع‌آوری و آماده‌سازی نمونه:
۱. گرفتن خون باید با استفاده از تکنیک استاندارد خون‌گیری ساهرگی انجام شود و به سرعت سرم از سلول‌های خونی جدا گردد. از انجام تست بر روی نمونه‌های لیپمیک همراه با کدورت و همولیز خودداری ننمایید. نمونه‌های پلاسما جهت انجام این تست مناسب نمی‌باشند.
  ۲. درب ظروف نمونه باید کاملاً بسته باشد و تا ۵ روز می‌توان آنها را در دمای ۲ تا ۸ درجه سانتی‌گراد و برای مدت طولانی‌تر حداکثر تا ۱ ماه در دمای ۲۰- درجه سانتی‌گراد نگهداری کرد.

#### آماده‌سازی معرف‌ها:

مخلوط شستشو: کل محتویات ویال مخلوط شستشو (۵۰x) را با ۹۸۰ میلی‌لیتر آب مقطر مخلوط کنید.

مخلوط رنگزا: ۱ میلی‌لیتر از مخلوط رنگزا A را با ۱ میلی‌لیتر از مخلوط رنگزا B مخلوط نمایید. مخلوط فوق بعد از ۱۰ دقیقه قابل استفاده و برای ۲ ردیف کافی می‌باشد.

توجه: در صورت مشاهده رنگ آبی در مخلوط رنگزا و یا کدورت و رشد باکتری، از این مخلوط استفاده نشود.

#### روش انجام آزمایش:

قبل از شروع آزمایش اطمینان حاصل کنید کلیه معرف‌ها و نمونه‌ها به دمای اتاق (۲۰ تا ۲۵ درجه سانتی‌گراد) رسیده‌اند. کلیه کالیبراتورها را با سر و ته کردن به آرامی مخلوط نمایید.

۱. تعداد چاهک‌های مورد نیاز برای انجام تست را برداشته و بقیه چاهک‌ها را همراه رطوبت گیر در کیسه آلومینیومی قرار داده درب آن را بسته و در دمای ۲ تا ۸ درجه سانتی‌گراد نگه دارید.

۲. ۲۵ میکرولیتر از کالیبراتورها و نمونه‌ها را در چاهک‌های مورد نظر بریزید. بهتر است که از هر نمونه یا کالیبراتور به صورت دوتایی (Duplicate) در چاهک‌ها ریخته شود.

توجه: حتماً چاهک اول به عنوان بلانک در نظر گرفته شود. در این چاهک نمونه و یا کالیبراتور ریخته نشود. بقیه مراحل با سایر چاهک‌ها یکسان می‌باشد.

۳. ۱۰۰ میکرولیتر مخلوط آنزیم کونژوگ (Enzyme Conjugate) به هر چاهک اضافه کنید و پلیت را به مدت ۳۰ ثانیه روی سطح میز به آرامی تکان دهید.

۴. چاهک‌ها را با جیب مخصوص پلیت بیوشانید و به مدت ۶۰ دقیقه (± ۱۰ دقیقه) در دمای اتاق انکوبه نمایید.

۵. محتویات چاهک‌ها را با وارونه کردن پلیت تخلیه کنید. سپس چاهک‌ها را ۵ مرتبه و هر مرتبه با ۳۰۰ میکرولیتر مخلوط شستشو

### Sensitivity

بر اساس جمع میانگین جذب نوری کالیبراتور صفر و سه برابر انحراف معیار، حداقل غلظت قابل تشخیص در این کیت ۰/۶ ng/ml می‌باشد.

### Hook effect

غلظت AFP تا ۱۰۰۰۰ ng/ml بررسی گردید و اثر هوک مشاهده نشد.

### References:

- Engall, E., Methods in Enzymology, Volume 70, Van Vunakis, H. and Langone, J. J. (eds.), Academic Press, New York, 41492 (1980).
- Uotila, M., Ruoslahti, E. and Engvall, E., J. Immunol. Methods, 42, 11-15 (1981).
- belev G I. Alpha-fetoprotein as a marker of embryo-specific differentiation in normal and human tissues. Transplant Rev; 20:3-37 (1974).
- Wild D, The Immunoassay Handbook, Stockton Press, 445 (1994).

Brochure Rev: 19 (1398/03/20)

در صورت بروز هر گونه مشکل خواهشمند است با شماره‌های مندرج بر روی جعبه (بخش پشتیبانی) تماس بگیرید.

### Recovery

در این تست دو نمونه سرم به نسبت مساوی با یکدیگر ترکیب شد و به عنوان یک نمونه، غلظت AFP در آن سنجش گردید.

NO.	Sample (ng/ml)	Added (ng/ml)	Exp. (ng/ml)	Obs. (ng/ml)	Rec. (%)
1	2.4	18.2	10.3	10.7	103.9
2	5.7	13.9	9.8	9.68	98.7
3	11.6	31.4	21.5	20.45	95.1
4	9.5	21.1	15.3	15.63	102.1

### Linearity

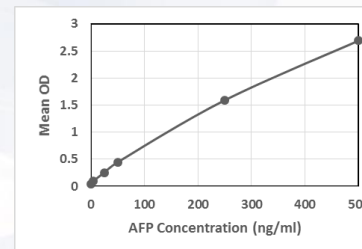
در این تست غلظت AFP در رقت‌های مختلف نمونه سرم برای تعیین خطی بودن کیت اندازه‌گیری شد.

NO.	Sample	Recovery %			
		1/2	1/4	1/8	1/16
1	12.9	97.7	98.6	99.5	98.2
2	17.5	95.8	97.4	98.5	96.6
3	22.1	102.3	103	97	97.2
4	27.3	99.4	99.3	98.7	100

### Specificity

اختصاصیت این آزمایش به کمک اضافه کردن غلظت‌های مختلفی از مواد مداخله‌گر به سرم، مورد سنجش قرار گرفت. واکنش متقاطع با اندازه‌گیری نسبت بین مقدار ماده مداخله‌گر به مقدار AFP مورد نیاز برای ایجاد همان مقدار جذب، سنجش شد.

Analyte	Cross Reactivity	Concentration
Acetylsalicylic Acid	ND	100µg/ml
Amethopterin	ND	100µg/ml
Ascorbic Acid	ND	100µg/ml
Atropine	ND	100µg/ml
Caffeine	ND	100µg/ml
CEA	ND	10µg/ml
PSA	ND	1.0µg/ml
CA-125	ND	10.000 U/ml
hCG	ND	1000 IU/ml
hLH	ND	10 IU/ml
hLH	ND	100 mlU/ml
hPRL	ND	100 µg/ml



### مقادیر مورد انتظار برای تست الایزای AFP

Expected value
< 8.5 ng/ml

### پارامترهای کنترل کیفی

#### Intra - Assay

دقت داخلی با ارزیابی تکرارپذیری سه نمونه سرم در یک نوبت تست انجام گردید.

Serum sample	1	2	3
No. of Repeats	20	20	20
Mean AFP (ng/ml)	2.9	10.3	25.91
S.D (ng/ml)	0.14	0.42	1.2
C.V (%)	4.8	4	4.6

#### Inter - Assay

ارزیابی دقت بین تستی با سه نمونه متفاوت سرم در ۳ نوبت هر نوبت ۵ بار انجام شد.

Serum sample	1	2	3
No. of Repeats	15	15	15
Mean AFP (ng/ml)	3.5	8.6	22.8
S.D (ng/ml)	0.19	0.51	1.3
C.V (%)	5.4	5.9	5.8

بشوید. اگر شستشو به صورت دستی انجام می‌شود در انتهای شستشو به آرامی پلیت را بر روی دستمال رطوبت‌گیر بزنید. ۶. ۱۰۰ میکرولیتر از محلول رنگزا درون تمام چاهک‌ها بریزید و پلیت را به مدت ۱۵ دقیقه در دمای اتاق و تاریکی انکوبه کنید. از تکان دادن پلیت در این مرحله خودداری کنید. توجه: اگر بالاترین میزان جذب نوری کالیبراتور کمتر از ۲ به دست آمده، می‌توانید زمان انکوباسیون محلول رنگزا را به مدت ۱۰ دقیقه افزایش دهید.

۷. ۵۰ میکرولیتر محلول متوقف‌کننده به کلیه چاهک‌ها اضافه کنید و پلیت را به مدت ۲۰ ثانیه به آرامی تکان دهید تا تمام رنگ آبی آن به زرد تبدیل شود.

۸. مقدار جذب را برای هر چاهک در طول موج ۴۵۰ نانومتر با استفاده از امتد Point to Point حداکثر تا ۱۵ دقیقه بعد از متوقف کردن واکنش بخوانید. از طول موج ۶۲۰ تا ۶۳۰ نانومتر استفاده کنید.

میزان جذب و نمودار کالیبراتورهای این کیت به عنوان نمونه در زیر آورده شده است.

Calibrators	Well Number	Abs	Mean Abs	Value (ng/ml)
Cal A	A1	0.051	0.049	0
	B1	0.048		
Cal B	C1	0.101	0.101	5
	D1	0.102		
Cal C	E1	0.246	0.255	25
	F1	0.265		
Cal D	G1	0.444	0.446	50
	H1	0.448		
Cal E	A2	1.609	1.591	250
	B2	1.573		
Cal F	C2	2.755	2.691	500
	D2	2.627		