

کیت اندازه‌گیری هورمون FT3 در سرم انسان FT3 ELISA Kit 96t Cat. NO: 3024-96 Brochure Rev: 11 (1399/03/11)

مقدمه:

تری‌یدوتیرونین (T3) یکی از هورمون‌های غده تیروئید است که با اتصال به پروتئین‌های حامل، در خون گردش می‌کند. اصلی‌ترین پروتئین حامل، گلوبولین متصل‌شونده به تیروکسین (TBG) است. بخش آزاد T3 (غیر متصل به پروتئین‌های حامل) مسئول کلیه اعمال بیولوژیکی این هورمون می‌باشد. همچنین غلظت پروتئین‌های حامل در شرایط کلینیکی متفاوت از جمله دوران بارداری دچار تغییر می‌شوند. در شرایط عملکرد نرمال تیروئید، با تغییر غلظت پروتئین‌های حامل، مقدار T3 تام (tT3) سرم نیز تغییر می‌کند. در حالیکه غلظت T3 آزاد (fT3)، ثابت باقی می‌ماند. بنابراین اندازه‌گیری fT3، از نظر بالینی ارزش بیشتری دارد. به عنوان مثال بارداری، مصرف قرص‌های ضد بارداری و درمان با استروژن، باعث بالا رفتن سطح tT3 در خون می‌شود، در حالیکه در این شرایط سطح fT3 بدون تغییر باقی می‌ماند. در این کیت، شرایط اندازه‌گیری مستقیم fT3 با یک حساسیت بهینه و با کمترین وسایل، فراهم شده است.

اصول آزمایش:

این تست بر اساس ایمنونواسی آنزیمی رقابتی طراحی شده است. در این روش، نمونه‌های سرم و کالیبراتورها که حاوی fT3 آزاد و غیر کونژوگه هستند به همراه fT3 کونژوگه با آنزیم HRP درون چاهک‌ها ریخته می‌شوند. در این صورت هر دو آنتی‌ژن برای اتصال به آنتی‌بادی ضد fT3 متصل شده به سطح پلیت با یکدیگر رقابت می‌کنند. بنابراین هر چه مقدار fT3 نمونه بیشتر

باشد، میزان fT3 کونژوگه کمتری به آنتی‌بادی متصل می‌شود. پس از تخلیه و شستشوی چاهک‌ها، اضافه کردن محلول رنگزا، منجر به پدید آمدن رنگ آبی می‌شود که با افزودن محلول متوقف‌کننده به رنگ زرد تغییر رنگ می‌دهد. این محصول در طول موج ۴۵۰ نانومتر بیشترین میزان جذب را دارد. شدت رنگ و در نتیجه میزان جذب، با غلظت fT3 موجود در نمونه و کالیبراتورها، نسبت معکوس دارد. در نهایت غلظت fT3 در نمونه‌ها توسط منحنی استاندارد (نمودار کالیبراتورها) محاسبه می‌گردد.

محتویات کیت:

۱. پلیت کوت شده با آنتی‌بادی ضد fT3 ۹۶ تستی. بسته‌بندی شده در کیسه آلومینیومی همراه با رطوبت‌گیر.
 ۲. کالیبراتورهای fT3 در مقادیر ۰، ۱/۸، ۳/۳، ۵/۷، ۸/۶، ۱۸ pg/ml، تهیه شده در سرم انسان.
- توجه: غلظت کالیبراتورها در هر سری تولید، ممکن است متفاوت باشد و مطابق با مقادیر درج شده بر روی لیبل ویال‌ها و گواهی آنالیز محصول (COA) می‌باشد.
۳. کونژوگه fT3: ۱ ویال ۱۱ میلی‌لیتری.
 ۴. محلول شستشو (۵۰X): ۱ ویال ۲۰ میلی‌لیتری.
 ۵. محلول رنگزا A: ۱ ویال ۶/۵ میلی‌لیتری.
 ۶. محلول رنگزا B: ۱ ویال ۶/۵ میلی‌لیتری.
 ۷. محلول متوقف‌کننده واکنش: ۱ ویال ۱۲ میلی‌لیتری.
 ۸. بر چسب مخصوص پلیت.

توجه: کلیه محلول‌ها در دمای ۲ تا ۸ درجه سانتی‌گراد نگهداری شوند. محلول متوقف‌کننده 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. با وجود اینکه محتویات این کیت با منشاء انسانی، 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
۶. در هنگام کار با کیت دقت فرمایید 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 سیاهرگی انجام شده و به سرعت سرم آن جدا گردد.
- از انجام تست بر روی نمونه‌های لیمبیک همراه با کدورت و همولیز خودداری نمایند. نمونه‌های پلاسما جهت انجام این تست مناسب نمی‌باشند.
۲. درب نمونه‌ها باید کاملاً بسته باشد و تا ۳ روز می‌توان آنها را در دمای ۲ تا ۸ درجه سانتی‌گراد و برای مدت طولانی‌تر، حداکثر تا ۱ ماه در دمای ۲۰- سانتی‌گراد نگهداری کرد.

آماده‌سازی معرف‌ها:

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

روش انجام آزمایش:

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

۱. تعداد چاهک‌های مورد نیاز برای انجام آزمایش را برداشته و بقیه چاهک‌ها را همراه رطوبت‌گیر در کیسه آلومینیومی قرار داده درب آن را بسته و در دمای ۲ تا ۸ درجه سانتی‌گراد نگهدارید.

۲. ۵۰ میکرولیتر از کالیبراتورها و نمونه‌ها در چاهک‌های مورد نظر بریزید. بهتر است که از هر نمونه یا استاندارد به صورت (Duplicate) در چاهک‌ها ریخته شود.

۳. ۱۰۰ میکرولیتر از محلول آنزیم کونژوگه (Enzyme Conjugate) به هر چاهک اضافه کنید و پلیت را به مدت ۳۰ ثانیه تکان دهید.

۴. چاهک‌ها را با برچسب 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 محلول شستشو بشویید. اگر شستشو به صورت دستی انجام می‌شود در انتهای شستشو به آرامی پلیت را بر روی دستمال رطوبت‌گیر بزنید.

Sensitivity

بر اساس جمع میانگین جذب کالیبراتور صفر و سه برابر انحراف معیار، حداقل غلظت قابل تشخیص در این کیت ۰/۸۴۰ pg/ml می‌باشد.

References:

- Schall, R. F. Jr., Fraser, A.S., Hansen, H.W., Kern, C.W., and Teneso H.J., A Sensitive Manual Enzyme Immunoassay for Thyroxine, Clin. Chem. 24 (10): 1801 (1978).
- Utiger, R.D., Serum Triiodothyronine in Man. Ann. Rev. Med, 25: 289-302 (1974).
- Larsen, P.R. and Ingbar, S.H.: The thyroid gland. In Wilson, J.H., and Foster, D.W. (Eds.): Williams Textbook of Endocrinology. 8th ed. Philadelphia, W.B. Saunders Co. (1992).
- Melmed S, et al. J Clin Endocrinol Metab. 18, 11, (1983).

Brochure Rev: 11 (1399/03/11)

در صورت بروز هرگونه 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 شده و به عنوان یک نمونه، غلظت ft3 در آن اندازه‌گیری شد.

NO.	Sample (pg/ml)	Added (pg/ml)	Exp. (pg/ml)	Obs. (pg/ml)	Rec. (%)
1	2.3	4.2	3.25	3.4	104.6
2	5.8	7.1	6.45	6.8	105.4
3	6.5	8.5	7.5	7.3	97.3
4	12.7	9.4	11.05	10.9	98.6

Linearity

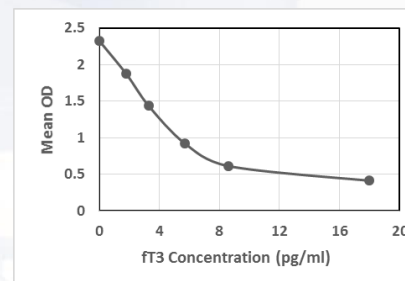
در این تست غلظت ft3 در رقت‌های مختلف نمونه سرم برای تعیین خطی بودن کیت اندازه‌گیری شد.

NO.	Sample	1/2	1/4	1/8
		Recovery %		
1	7.7	99.3	99.2	97
2	8.3	100.1	98.5	99.3
3	9.5	97.4	102.3	98.6
4	13.8	99.4	97.5	101.5

Specificity

اختصاصیت این آزمایش با 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 تری‌یدو تیروئین مورد نیاز برای ایجاد همان مقدار جذب سنجش شد.

Analyte	Cross Reactivity	Concentration
L-T3	1	
L-T4	<0.0002	10 µg/ml
Iodothyrosine	<0.0001	10 µg/ml
Diiodothyrosine	<0.0001	10µg/ml
Diiodothyronine	<0.0001	10µg/ml
Phenylbutazone	<0.0001	10µg/ml
Sodiumsalicylate	<0.0001	10µg/ml

**مقادیر مورد انتظار برای تست ft3 به روش ELISA**

Normal Range	Pg/ml
Adult	1.4 – 4.2
Pregnancy	1.8 – 4.2

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 ft3 (pg/ml)	2.8	6.1	14.5
S.D (pg/ml)	0.12	0.33	0.54
C.V (%)	4.2	5.4	3.7

Inter - Assay

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

Serum sample	1	2	3
No. of Repeats	15	15	15
Mean ft3 (pg/ml)	3.4	7	12.9
S.D (pg/ml)	0.21	0.36	0.57
C.V (%)	6.2	5.1	4.4

۶. ۱۰۰ میکرولیتر از محلول رنگزا درون تمام چاهک‌ها بریزید و پلیت را به مدت ۱۵ دقیقه در دمای اتاق و تاریکی انکوبه نمایید. از تکان دادن پلیت در این مرحله خودداری کنید. توجه: اگر بالاترین میزان جذب کالیبراتور کمتر از ۲ به دست آمد، می‌توانید زمان انکوباسیون محلول رنگزا را به مدت ۱۰ دقیقه افزایش دهید.

۷. ۵۰ میکرولیتر از محلول متوقف‌کننده واکنش 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 متد Point to Point حداکثر تا ۱۵ دقیقه بعد از متوقف کردن واکنش بخوانید. (از طول موج فرانس ۶۳۰-۶۲۰ 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 (pg/ml)
Cal	A1	2.300	2.326	0
A	B1	2.352		
Cal	C1	1.864	1.875	1.8
B	D1	1.886		
Cal	E1	1.423	1.435	3.3
C	F1	1.447		
Cal	G1	0.993	0.923	5.7
D	H1	1.027		
Cal	A2	0.587	0.613	8.6
E	B2	0.639		
Cal	C2	0.384	0.412	18
F	D2	0.440		

توجه: غلظت کالیبراتورها در هر سری تولید ممکن است متفاوت باشد لذا جهت آزمایش، به غلظت ذکر شده بر روی لیبل ویال کالیبراتورها و گواهی آنالیز محصول (COA) مراجعه نمایید.