کیت ایمونو آنزیماتیک (EIA) پادتن علم (۹۶ تستی)

β2 Microglobulin

موارد استفاده:

تعیین کمّی β2M در سرم یا پلاسما

I. مقدمه:

بتا ۲- میکروگلوبولین (β2M) پروتئینی با وزن ملکولی ۱۱۸۰۰ دالتون برای اولین بار از ادرار بیماری مبتلا به پروتئین یوری توبولر استخراج شد[۱]. این پروتئین بخشی از ساختمان آنتی ژن سازگار یافته (HLA) کلاس I بوده و در سطح غشای سلول های هسته دار خصوصاً لنفوسیتها دیده می شود[۲-۴] . β2M به طور طبیعی از سطح سلول ها جدا شده و در سرم و ادرار قابل ردیابی است[۵]. غلظت β2M سرمی نشان دهنده میزان تولید آن در خون و قابلیت پاکسازی آن از طریق کلیه ها است. معمولاً کمتر از یک درصد β2M از طریق کلیه ها دفع شده و باقی آن از طریق توبولهای پروکسیمال کلیوی بازجذب می شود . لذا اختلال عملکرد این توبول ها منجر به افزایش غلظت β2M در ادرار می گردد. غالباً سطح سرمی این پروتئین در اختلالات لنفوپرولیفراتیو بزرگسالان (لوسمی لنفوسیتی مزمن، لنفوما و گاماپاتی مونوکلونال ...) [۶-۹] و بیماری های التهابی (آرتریت روماتوئید، لوپوس اریتماتوز، بیماری کرون...) افزایش می یابد [۱۰-۱۳] .

بررسی سطح سرمی β2M شاخص مناسبی برای نظارت بر درمان و تغییر در وضعیت بالینی بیماران مبتلا به نارسایی های کلیوی و اختلالات فوق الذکر می باشد .

II. اصول اندازه‌گیری:

کیت اندازه‌گیری کمی β2M بر مبنای سنجش واکنش ایمونوآنزیماتیک روی فاز جامد طراحی شده است. در این سیستم از دو آنتی بادی (آنتی بادی پلی کلونال خرگوش و آنتی بادی مونوکلونال موش) که شاخص‌های آنتی ژنتیک متمایزی را روی مولکول β2M شناسایی می‌کنند، استفاده شده است . ابتدا به حفره‌های پلی استایرن پوشیده شده با آنتی بادی پلی کلنال β2M، استانداردها ، سرم کنترل ها و نمونه های بیماران افزوده می شود. در حین انکوباسیون اول، β2M موجود در نمونه ها به آنتی بادی های ضد β2M متصل و سپس بقیه مواد از طریق تخلیه و شستشو از سیستم خارج می شوند . پس از شستشو آنتی بادی دوم ضد β2M که به آنزیم پراکسیداز (HRP) متصل شده است به حفره‌ها افزوده می شود . پس از دومین انکوباسیون و شستشو ، افزودن سوبسترای TMB (۳ و ´۳ – ۵ و ´۵ تترامتیل بنزیدین) سبب ایجاد رنگ آبی توسط آنـزیم می‌شود. رنگ‌زایی واکنش آنزیماتیک با افـــزودن محلول متوقف کننده،خاتمه یافته و رنگ آبی ایجاد شده به رنگ زرد تبدیل می‌شود. شدت رنگ ایجاد شده به وسیله یک اسپکتروفتومتر مخصوص میکروپلیت در طول موج ۴۵۰ نانومتر اندازه‌گیری می‌شود. برای تعیین غلظت β2M نمونه ها ابتدا منحنی جذب نوری استانداردها بر حسب غلظت β2M رسم و سپس غلظت نمونه از روی منحنی استاندارد تعیین می شود. شدت رنگ ایجاد شده با غلظت β2M موجود در نمونه ها نسبت مستقیم دارد .

III. محتویات کیت:

محلولهای این کیت (Cat.No.P-BMI) جهت انجام ۹۶ تست بوده و تاریخ انقضای هر یک بر روی شیشه آن درج شده است. دمای مناسب برای نگهداری کیت ۸-۲ درجه سانتیگراد می‌باشد.

۱. **پلیت:** پلیت ۹۶ حفره‌ای پوشش داده شده با آنتی بادی‌های پلی کلنال ضد β2M خرگوش.

۲. **استانداردها:** ۷ ویال ۰/۸ میلی‌لیتری استاندارد β2M حاوی سرم انسانی، PBS، پروتئین و تیمروزال . غلظت دقیق β2M استانداردها که بر مبنای استاندارد سازمان جهانی بهداشت IS1st β2M کالیبر شده اند بر روی برچسب آنها درج شده است.

۳. **کنترل‌های سرمی:** ۲ ویال ۰/۸ میلی لیتری سرم انسانی حاوی PBS، پروتئین و تیمـــروزال. غلظت دقیق β2M کنتـــرل‌ها بر روی برچسب آنها درج شده است.

۴. **محلول رقیق کننده نمونه:** دو ویال ۵۰ میلی لیتری محلول PBS حاوی پروتئین و تیمروزال.

۵. **ردیاب آنزیمی:** یک ویال ۱۲ میلی لیتری آنتی بادی منوکلنال ضد β2M متصل به پراکسیداز (HRP) محلول در بافر PBS، حاوی پروتئین و تیمروزال.

۶. **بافر واکنش:** یک ویال ۲۵ میلی لیتری محلول PBS، حاوی پروتئین و تیمروزال.

۷. **محلول شستشوی غلیظ (۲۰X):** یک ویال ۲۵ میلی لیتری محلول حاوی PBS–Tween 20 و تیمروزال.

۸. **محلول رنگ زا:** یک ویال ۱۲ میلی لیتری بافر H_2O_2 و TMB.

۹. **محلول متوقف کننده واکنش:** یک ویال ۱۲ میلی لیتری H_2SO_4 دو نرمال.

IV. وسایل مورد نیاز (این وسایل همراه کیت عرضه نمی‌شوند):

۱. دستگاه اسپکتروفتومتر میکروپلیت با دامنه جذب نوری ۳-۰ در طول موج ٤٥٠ نانومتر با دیفرانسیل ٦٣٠ نانومتر.
۲. میکروپیپت قابل تنظیم بر روی ۱۰ تا ۱۰۰۰ میکرولیتر و تیپ های یکبار مصرف
۳. آب مقطر یا آب دیونیزه برای رقیق کردن محلول شستشو .

V. نحوه جمع‌آوری و آماده‌سازی نمونه‌ها:

نمونه مناسب جهت اندازه‌گیری β2M سرم یا پلاسمای هپارینه بیمار است . این نمونه‌ها تا دو هفته در دمای ۸-۲ درجه سانتی‌گراد قابل نگهداری است. برای نگهداری نمونه‌ها به مدت طولانی‌تر، سرم یا پلاسمای بیمار را در حجم های کم تقسیم نموده و در ۲۰- درجه سانتی‌گراد نگهداری نمایید. بهتر است از ذوب شدن و یخ زدن مکرر نمونه‌ها اجتناب نمود. برای اندازه‌گیری β2M نمونه‌های منجمد شده، ابتدا نمونه را در حرارت اتاق ذوب و سپس با حرکت دست یکنواخت نمایید. برای یکنواخت کردن نمونه‌ها از Vortex استفاده ننمائید. برای اندازه‌گیری دقیق نمونه‌هائی که غلظت β2M آنها بیش از آخرین استاندارد است، ابتدا نمونه‌ها را با محلول رقیق کننده کیت، رقیق نموده، سپس اندازه‌گیری مجدد به عمل آورید. بدیهی است در محاسبه نتایج این نمونه‌ها، ضریب رقت منظور می‌شود.

VI. آماده سازی محلول ها:

۱. نمونه های سرم را به کمک بافر رقیق کننده نمونه به نسبت ۱ به ۱۰۰ رقیق کنید (۱۰ میکرولیتر نمونه به ازای ۱۰۰۰ میکرولیتر بافر رقیق کننده).

۲. محلول شستشوی غلیظ به نسبت یک به بیست با آب مقطر یا دیونیزه رقیق شود. (یک حجم محلول شستشوی غلیظ به ازاء ۱۹ حجم آب) محلول شستشوی رقیق را تا یک هفته در دمای ۸-۲ درجه سانتی‌گراد می‌توان نگهداری کرد. در صورت مشاهده کریستال در محلول غلیظ شستشو ، ویال را به مدت چند دقیقه در ۳۷ درجه سانتیگراد قرار دهید تا محلول یکنواخت گردد.

VII. روش کار:

قبل از شروع کار باید دمای تمامی محلولها به دمای اتاق برسد.

۱.ابتدا ۲۵ میکرولیتر از استانداردها، سرم کنترل‌ها و نمونه های سرمی رقیق شده بیماران را در داخل حفره‌ها ریخته، سپس ۲۰۰ میکرو لیتر از بافر واکنش را به حفره‌های مربوطه اضافه نمایید.

۲.پلیت را با برچسب مخصوص پوشانده و به مدت ۳۰ دقیقه در دمای اتاق قرار دهید.

۳.حفره ها را ۴ بار با ۳۰۰ میکرولیتر محلول شستشو بشویید.

۴. به هر حفره ۱۰۰ میکرولیتر از کونژوگه ضد β2M (HRP) اضافه نمایید و ۳۰دقیقه در دمای اتاق قرار دهید.

۵. حفره ها را ۴ بار با ۳۰۰ میکرولیتر محلول شستشو بشویید.

۶. به هر حفره ۱۰۰ میکرو لیتر سوبسترای TMB اضافه کنید .

۷.پلیت را به مدت ۱۵ دقیقه در دمای اتاق و در محلی تاریک قرار دهید.

۸. ۱۰۰ میکرولیتر از محلول متوقف کننده واکنش در هر حفره ریخته و به مدت ۱۰ ثانیه مخلوط کنید.

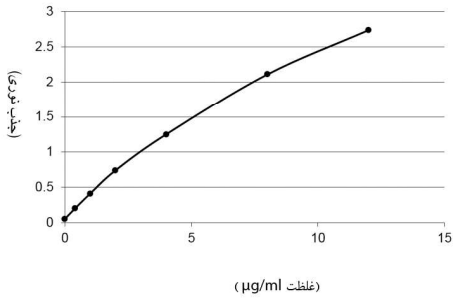
۹. میزان جذب نوری حفره‌ها را در طول موج ۴۵۰ نانومتر (با طول موج دیفرانسیل ۶۳۰ نانومتر) حداکثر تا ۱۵ دقیقه بعد از افزودن محلول متوقف کننده، بخوانید.

VIII. محاسبه نتایج:

پس از تعیین میزان جذب نوری استانداردها و نمونه ها و ترسیم منحنی استاندارد، غلظت β2M بیماران را می توان محاسبه کرد.
در منحنی مذکور که با استفاده از دستگاه الایزا ریدر (قابل برنامه ریزی) و یا به صورت دستی ترسیم می شود ، محور Y شاخص میزان جذب نوری استانداردها در طول موج ۴۵۰ نانو متر و محور X شاخص غلظت استانداردها β2M بر حسب μg/ml است . نتایجی که در جدول زیر آمده فقط مثال هستند و نباید برای تفسیر نتایج از آنها استفاده شود .

غلظت β2M (μg/ml)	جذب نوری	نمونه
۰/۰	۰/۰۵	استاندارد A
۰/٤	۰/۲۰	استاندارد B
۱/۰	۰/٤۱	استاندارد C
۲/۰	۰/۷٤	استاندارد D
٤/۰	۱/۲۵	استاندارد E
۸/۰	۲/۱۱	استاندارد F
۱۲/۰	۲/۷٤	استاندارد G
٤/۱	۱/۲۷	سرم

برای ترسیم منحنی از ارزش های مندرج بر روی ویال استانداردها استفاده کنید.



IX. مقادیر طبیعی:

با استفاده از سرم ۳۰۰ فرد سالم مقادیر طبیعی β2M با کیت پادتن علم تعیین گردید. در این مطالعه افراد بر اساس سن در ۳ گروه قرار داده شده اند. نتایج بدست آمده که در جدول زیر آمده است نشان دهنده افزایش غلظت β2M با بالارفتن سن می باشد.

سن	تعداد	غلظت متوسط (µg/ml)	انحراف معیار (µg/ml)
کمتر از ۴۰ سال	۱۰۰	۱.۴۴	۱.۲
۴۰-۶۰ سال	۱۰۰	۱.۷۰	۱.۴
بیش از ۶۰ سال	۱۰۰	۲.۳۱	۱.۷

مقادیر طبیعی β2M در سرم برای افراد سالم کمتر از ۳ µg/ml گزارش شده است. نتایج بالا بعنوان یک راهنمای کلی ارائه شده است و توصیه می شود که هر آزمایشگاه با در نظر گرفتن غلظت سرمی β2M افراد سالم دامنه طبیعی آنرا تعیین و از آن برای تفسیر نتایج بیماران استفاده کند.

X. ویژگی‌های اختصاصی تست:

۱. حساسیت: به حداقل غلظت β2M که اختلاف جذب نوری آن نسبت به جذب نوری استاندارد صفر، معنی دار باشد حساسیت کیت گفته می شود. این مقدار برای کیت β2M پادتن علم µg/ml ۰/۱ است.

۲. اثر Hook: در کیت β2M پادتن علم برای نمونه های رقیق نشده تا غلظت ۸mg/ml اثر Hook مشاهده نشده است.

۳. مقایسه با روش کمی لومینسانس: برای بررسی همبستگی آماری بین کیت EIA پادتن علم و کیت LIAISON ، غلظت β2M بر روی ۵۰۰ نمونه تصادفی با هر دو کیت اندازه گیری شد. مقایسه نتـــایج به دست آمده ، ضریب همبستگی ۰/۹۷ را نشان می دهد.

۴. اختصاصی بودن کیت پادتن علم: اختصاصی بودن تستβ2M با اندازه گیری غلظت β2M بعد از افزودن مقادیر بالایی از ایمونوگلوبولینG (IgG) به غلظت µg/ml ۲۰ مورد بررسی قرار گرفت. بررسی غلظت β2M در نمونه قبل و بعد از افزودن IgG حاکی از اختصاصی بودن آنتی بادی پلی کلنال آنتی β2M مورد استفاده در این کیت می باشد.

۵. دقت: شاخص دقت کیت با مقـایسه تکـــــرار پذیـــــری جواب ها به روش میـــــان سنجی (Inter -assay) و درون سنجی (Intra -assay) تعیین شده است . برای این منظور ۳ نمونه سرم ۱۰ بـــار در یک دوره آزمایش (درون سنجی) و یکبار در ۱۰ دوره آزمایش متفاوت (میان سنجی) تعیین غلظت شد ه است. نتـایج انحراف معیار (SD) و ضریب تغییرات (CV) در جـــدول زیر آمده است.

جدول شاخص دقت

درون سنجی			میان سنجی			
CV ٪	SD	میانگین (µg/ml)	CV ٪	SD	میانگین (µg/ml)	
۶/۸	۰/۰۳	۰/۴۹	۸/۱	۰/۰۴۲	۰/۵۲	۱
۴/۱	۰/۰۵	۱/۱۷	۵/۸	۰/۰۶۷	۱/۱۷	۲
۴/۳	۰/۱۷	۳/۹۵	۳/۴	۰/۱۳	۳/۹۲	۳

۶. ریکاوری و رقت: ریکاوری به حالتی اطلاق می شود که با افزودن حجم معینی از یک محلول با غلظت بالا به نمونه رقیق تر ، افزایش غلظت حاصل شود. برای تعیین ریکاوری ، محلولی با غلظت بالای β2M به نمونه سرمی که غلظت پائینی از β2M دارد، افزوده شده است. درصد ریکاوری طبق فرمول زیر محاسبه می شود :

$$\frac{\text{غلظت اندازه‌گیری شده } \mu g/ml}{\text{غلظت پیش‌بینی شده } \mu g/ml} \times ۱۰۰$$

دامنه درصد ریکاوری به دست آمده از ۹۳ تا ۱۰۶ است .

جدول ریکاوری

ریکاوری٪	غلظت اندازه‌گیری شده µg/ml	غلظت پیش‌بینی شده µg/ml	حجم افزوده شده µl
–	۰/۶	–	–
۱۰۲	۱/۲	۱/۱۸	۱۰
۹۳	۲/۵	۲/۷	۵۰
۱۰۶	۵/۲	۴/۹	۲۰۰

برای بررسی خطی بودن نتایج کیت β2M شرکت پادتن علم چندین نمونه سرمی غلیظ، پس از رقیق شدن متوالی با استاندارد صفر، اندازه گیری شده و نتایج یک نمونه برای مثال در جدول زیر آورده شده است . دامنه درصد ریکاوری به دست آمده از ۹۲ تا ۱۰۲ است .

جدول رقت

ریکاوری٪	غلظت اندازه‌گیری شده µg/ml	غلظت پیش‌بینی شده µg/ml	رقت
–	۱۰/۲۵	–	–
۱۰۲	۵/۲	۵/۱۲	۱:۲
۹۶	۲/۵	۲/۶	۱:۴
۹۲	۱/۲	۱/۳	۱:۸

XI. Reference:

1.Berggard I, Bearn AG. Isolation and Properties of a Low Molecular Weight β2-Globulin Occurring in Human Biological Fluids. J Biol Chem 1968: 243:4095.
2.Grey HM, Kubo RT, et al. The Small Subunit of HL-A Antigens is β2-Microglobulin. J Exp Med 1973; 138:1608.
3.Nakamuro K, Tanigaki N, Pressman D. Multiple Common Properties of Human β2-Microglobulin and the Common Portion Fragment Derived from HL-A Antigen Molecules. Proc Natl Acad Sci USA 1973; 70:2863.
4. Governa M, Biguzzi S. β2-Microglobulin Distribution in Human Normal Tissues. Eur J Immunol 1976; 6:830.
5. Evrin PE, Wibell L. The Serum Levels and Urinary Excretion of β2-Microglobulin in Apparently Healthy Subjects. Scand J Clin Lab Invest 1972; 29:69.
6. Morell A, Riesen W. Serum β2-Microglobulin, Serum Creatinine and Bone Marrow Plasma Cells in Benign and Malignant Monoclonal Gammopathy. Acta Haematol 1980; 64:87.
7. Bataille R, Durle BGM, et al. Prognostic Factors and Staging in Multiple Myeloma: A Reappraisal. J Clin Oncol 1986; 4:80.
8. Cassuto JP, Krebs BP, et al. β2-Microglobulin. A Tumour Marker of Lymphoproliferative Disorder. Lancet 1978; ii:950.
9. Simonsson B, Wibell L, Nilsson K. β2-Microglobulin in Chronic Lymphocytic Leukaemia. Scand J Haematol 1980; 24:174.
10. Crisp AJ, Coughlan RJ, et al. β2-Microglobulin Plasma Levels Reflect Disease Activity in Rheumatoid Arthritis. J Rheumatol 1983; 10:954.
11. Weissel M, Scherak O, et al. Serum β2-Microglobulin and SLE. Arthritis Rheum 1976; 19:968.
12. Sturm T , Evrin PK , Karlsson A. Serum β2- Microglobulin Sjgren AEs Syndrome. Scand J Rheumatol 1978; 7:97.
13.Descos L,Andre C,et al.Serum Levels of β2 -Microglobulin- A New Marker of Activity in Crohn AEs Disease. New Engl J Med 1979;301:440.

احتیاط!
با توجه به اینکه محلول‌های به‌کار رفته در این کیت‌ها حاوی مواد سمی مانند تیمروزال و مواد پروتئینی با منشا انسانی و حیوانی هستند، و اینکه با هیچ تستی نمی توان از عدم وجود ویروس‌هایی چون HIV، HBV، HCV در این محلول‌ها اطمینان کامل حاصل کرد، خواهشمند است هنگام کار احتیاط‌های لازم از جمله استفاده از دستکش ، امتناع از خوردن و آشامیدن و سیگار کشیدن، خودداری از پیپت کردن با دهان و پرهیز از هرگونه تماس محلول با چشم و دست ها، رعایت شود.

Rev: Jul 2020
تهران ۱۴۱۶۸، خیابان طالقانی غربی، خیابان شهید سرپرست (کیوان جنوبی)، پلاک ۲۶
تلفن(۵ رقمی) : ۶۳۴۸۱ تلفن و فکس: ۶۶۴۰۰۹۶۹