

کیت الایزا برای تعیین غلظت تام هورمون پروژسترون انسانی

(۹۶ تستی)

Human Total Progesterone ELISA Kit

مقدمه

پروژسترون یک هورمون استروئید ۲۱ کربنی است که از کلسترول بافتی و جریان خونی سنتز می شود. کلسترول به پرگنه نولون تبدیل شده سپس از طریق دو واکنش دهیدروناز و ایزومراز به پروژسترون تبدیل می گردد. محل عمده تولید پروژسترون غدد فوق کلیوی و تخمدان ها و در دوران بارداری جفت می باشد. قسمت عمده این استروئید در کبد به pregnanediol متابولیزه شده و بصورت کونژوگ به گلوکوکورونید از طریق کلیه ها دفع می گردد. درصد بسیار کمی از پروژسترون در جریان خون بصورت آزاد (۲/۴ درصد) است و عمده آن بصورت متصل به پروتئین های سرم موجود می باشد.

این هورمون استروئیدی، یک هورمون جنسی زنانه است که همراه با استروژن ها، در تنظیم بافت های موثر در سیکل ماهیانه و آماده سازی جدار رحم برای لانه گزینی تخمک و نگهداری حاملگی نقشی موثر داراست.

اساس روش اندازه گیری

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

معرف ها

- ۱- میکروپلیت پوشش داده شده: شامل ۹۶ چاهک جداشدنی که با آنتی بادی ضد پروژسترون تهیه شده در گوسفند پوشش داده شده اند.
- ۲- کونژوگ آنزیمی (HRP-Progesterone): یک ویال ۱۲ میلی لیتری آماده مصرف.
- ۳- استانداردها: ۶ ویال یک میلی لیتری از استاندارد با غلظت های پروژسترون ۰، ۰/۵، ۱، ۲۵ و ۵۰ 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 ۲۵ 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 ۲۰۰ میکرولیتری دقیق
- ۲- آب دیونیزه

- ۳- دستگاه الایزا ریدر دارای فیلتر ۴۵۰ نانومتری و در صورت امکان ۶۳۰ نانومتری بعنوان فیلتر فرانس.
- ۴- کاغذ جاذب رطوبت
- ۵- انکوباتور 37 ± 1 درجه سانتیگراد

نکات قابل توجه برای مصرف کنندگان

- ۱- از تماس محلول متوقف کننده واکنش ($1N H_2SO_4$) خودداری کنید. در صورت تماس، با آب فراوان آنرا بشوئید.
- ۲- از استفاده از مواد پس از تاریخ انقضاء خودداری کنید و از مخلوط کردن یا استفاده از کیت ها با شماره بچ مختلف پرهیز نمائید.
- ۳- درب ظروف را پس از استفاده ببندید و از تعویض درب ها جدا خودداری کنید.
- ۴- 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 سروته نمائید.
- 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، سرم کنترل و نمونه های بیمار را انتخاب کنید و مابقی چاهک ها را همراه ماده آبگیر 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- ۲۰۰ میکرولیتر از کونژوگ آنزیمی (HRP-Progesterone) را به تمام چاهک ها اضافه کنید.
- ۴- پلیت را بمدت ۳۰ ثانیه به آرامی تکان دهید تا محتویات چاهک ها خوب مخلوط شوند. سپس درب چاهک ها را با برچسب مخصوص پلیت پوشانده و چاهک ها را بمدت یک ساعت در درجه حرارت ۳۷ درجه سانتیگراد و تاریکی انکوبه کنید.
- 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 سوبسترای 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.

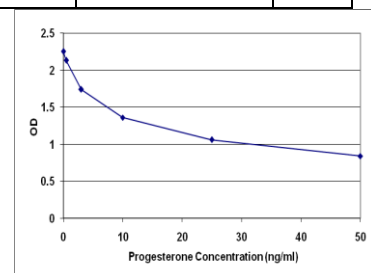
محاسبه نتایج

۱- با استفاده از میانگین جذب نوری استاندارد ها (محور Y) و غلظت مشخص آنها (محور X) بر روی کاغذ میلی متری، منحنی استاندارد ی 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	2.25
2	0.5	
3	3.0	
4	10	
5	25	
6	50	



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:

۱- مردان

بزرگسالان 0.13 – 0.97 ng/ml
کودکان (قبل از سن رشد) 0.70 – 0.52 ng/ml

۲- زنان

فاز فولیکولی 0.15 – 0.70 ng/ml
فاز لوتئال 2.00 – 25.0 ng/ml
دوران یائسگی 0.06 – 1.60 ng/ml

۳- حاملگی

سه ماهه اول 10.3 – 44.0 ng/ml
سه ماهه دوم 19.5 – 82.5 ng/ml
سه ماهه سوم 65.0 – 229 ng/ml

برای تبدیل واحدها به شرح ذیل می توان عمل کرد:

$$\text{ng/ml} \times 3.175 = \text{nmol/L}$$

خصوصیات کیت

۱- حساسیت

با رقیق سازی متوالی استاندارد ۰/۵ با سرم صفر، حساسیت این کیت برای تعیین مقدار هورمون پروژسترون برابر ۰/۱ 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	1.12	0.10	8.9
2	20	3.5	0.24	6.8
3	20	15.5	0.90	5.8

ضریب تغییرات در روزهای مختلف

نمونه سرم	دفعات تکرار	میانگین (ng/ml)	انحراف معیار	ضریب تغییرات (CV)
1	10	2.3	0.19	8.3
2	10	8.6	0.37	4.3
3	10	22.7	0.83	3.6

۳- ویژگی

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

نوع ماده	غلظت (ng/ml)	درصد تداخل
پروژسترون		۱۰۰
تستوسترون	۵۰۰	۰/۰۴
استرادیول	۵۰۰	۰/۰۳
کورتیزون	۱۰۰۰	۰/۰۹

۴- خطی بودن

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

نمونه سرمی	غلظت اولیه (ng/ml)	درصد بازیابی		
		1:8	1:4	1:2
1	3.2	107	105	102
2	12.6	106	103	102
3	44.3	104	104	101

منابع

- Dunn J.F., Nisula B.C., Rodbardo D. Transport of steroid hormones: binding of 21 endogenous steroids to both testosterone binding globulin and corticosteroid binding globulin in human plasma. Journal of Clinical Endocrinology, 53: 58 – 68, 1981.
- Abdulla U., Hipkin L.J., Diver M.J., Davis J.C. Plasma progesterone levels as an index of ovulation. British Journal of Obstetrics and Gynaecology, 90: 543 – 548, 1983.
- O'Neill C., Ferrier A.J., Vaughan J., Sinosich M.J., Saunders D.M. Causes of implantation failure after in vitro fertilization and embryo transfers. Lancet, 615, 1985.