

کیت الایزا برای تعیین غلظت پرولاکتین انسانی

Human Prolactin ELISA Kit

مقدمه :

پرولاکتین پلی پپتیدی با وزن مولکولی ۲۳۰۰۰ دالتون است که توسط سلول های لاکتوتروپ هیپوفیز قدامی سنتز و ترشح می شود. سنتز و ترشح پرولاکتین توسط هورمون های هیپوتالاموسی هورمون رها کننده تیروتروپین (TRH) و فاکتور مهارکننده پرولاکتین (PIF) کنترل می شود. TRH با تحریک و PIF با مهار ترشح پرولاکتین عمل می کند.

پرولاکتین در سرم مردان و زنان طبیعی و برخی از مایعات بدن نظیر مایع مغزی نخاعی، منی و مایع آمنیوتیک وجود دارد. عملکرد فیزیولوژیک اصلی پرولاکتین تحریک رشد پستان و تولید شیر در زنان باردار است. در سه ماهه سوم بارداری غلظت پرولاکتین بطور قابل توجهی افزایش می یابد و بعد از زایمان تا پایان شیردهی نوزاد در سطح بالا باقی می ماند. شیردهی ترشح پرولاکتین را تحریک می کند که باعث تداوم تولید شیر و توقف شروع مجدد عادت ماهیانه می شود. سطوح بالای پرولاکتین با گالاکتوره (جریان خودبخودی شیر از پستان) و آمنوره (فقدان عادت ماهیانه) همراه است. در غیاب بارداری، هیپرپرولاکتین میا، گالاکتوره و آمنوره نشانه وجود یک فرایند پاتولوژیک است. شایع ترین علت این علائم تومورهای تولید کننده پرولاکتین هیپوفیز می باشد.

اساس روش اندازه گیری :

کیت الایزا پرولاکتین موجود، براساس سنجش ایمنولوژیکی آنزیمی ساندویچی تهیه شده است. پرولاکتین موجود در نمونه ها بعنوان آنتی ژن به دو آنتی بادی زوج اختصاصی خود متصل می گردد. هر دو آنتی بادی از نوع منوکلونال موشی هستند که یکی برروی فاز جامد (چاهک ها) پوشش داده شده است و دیگری به آنزیم HRP متصل شده است. نمونه مورد آزمایش که دارای پرولاکتین است، در معرض دو آنتی بادی قرار می گیرد. پس از زمان انکوباسیون، چاهک ها تخلیه شده و شستشو داده می شوند تا آنتی بادی متصل به آنزیم HRP اضافی خارج گردد. سپس به هرچاهک سوبسترای آنزیم اضافه می شود که فعالیت آنزیم بطور مستقیم با غلظت پرولاکتین در نمونه ها متناسب است. استانداردهای پرولاکتین با غلظت مشخص، همراه با نمونه های مجهول آزمایش می شوند که براساس منحنی استاندارد جذب نور در مقابل غلظت پرولاکتین، غلظت نمونه های مجهول بدست می آید.

معرف ها :

- ۱- میکروپلیت پوشش داده شده: شامل ۹۶ چاهک جداسدنی که با آنتی بادی منوکلونال موشی علیه پرولاکتین پوشش داده شده اند.
- ۲- کونژوگ آنزیمی (HRP-Anti-Prolactin) : یک ویال ۱۲ میلی لیتری آماده مصرف.
- ۳- استانداردها : ۶ ویال یک میلی لیتری از استاندارد پرولاکتین با غلظت های ۰، ۵، ۱۰، ۲۵، ۵۰ و ۱۰۰ 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 مقطر 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 ۵۰ و ۱۰۰ میکرولیتری دقیق

۲- آب دیونیزه

۳- دستگاه الایزا ریدر دارای فیلتر ۴۵۰ نانومتری و در صورت امکان ۶۳۰ نانومتری بعنوان فیلتر رفرانس.

۴- کاغذ جاذب رطوبت

۵- انکوباتور 37 ± 1 درجه سانتیگراد

نکات قابل توجه برای مصرف کنندگان :

- ۱- در این کیت از سرم انسانی استفاده شده است که از نظر HbsAg و HIV منفی بوده اند.
- ۲- از تماس محلول متوقف کننده واکنش ($1N H_2SO_4$) با پوست خودداری کنید. در صورت تماس، با آب فراوان آترا بشوئید.
- ۳- 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.
- ۴- درب ظروف را پس از استفاده ببندید و از تعویض درب ها جدا خودداری کنید.
- ۵- محلول های محتوی مواد افزودنی یا نگهدارنده مثل سدیم آزاید نباید در واکنش آنزیمی وارد شوند.
- ۶- کیت های باز نشده پس از تحویل باید در دمای ۸-۲ درجه سانتی گراد (یخچال) نگه داری شوند. میکروپلیت باید در کیسه در بسته به همراه ماده جاذب رطوبت نگه داری شود. کیت باید تا تاریخ انقضاء استفاده شود (یکسال از زمان تولید). برای اطلاع از تاریخ انقضاء به برچسب کیت مراجعه شود.
- ۷- کیت های باز شده حداقل به مدت ۴ ماه پایدار خواهد ماند، اگر در شرایط توصیه شده در بالا نگهداری شود.
- ۸- توصیه می شود که بیشتر از ۳۲ چاهک در هر مرحله کاری استفاده نشود. اگر پی پت به صورت دستی انجام می گیرد، پی پت کردن همه استانداردها، نمونه ها ، کنترل ها باید در ۵ دقیقه تمام شود. برای پی پت کردن کل پلیت ۹۶ تستی باید از پی پت اتوماتیک استفاده شود.
- ۹- فرآیند شستشو خیلی مهم است. شستشوی ناکافی باعث کاهش دقت و افزایش کاذب جذب می شود.

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.
- ۴- در مواردی که مقدار پرولاکتین نمونه بیش از 100 ng/ml باشد، نمونه را با استاندارد صفر رقیق نموده و سپس آزمایش را تکرار نمائید.

آماده سازی معرف ها :

- ۱- کلیه معرف ها را به دمای اتاق برسانید. قبل از استفاده آنها را به آرامی کاملاً سر و ته نمائید.
- ۲- برای تهیه محلول شستشوی آماده مصرف، یک حجم از بافر شستشو غلیظ (20X) را با ۱۹ حجم آب مقطر رقیق نمائید. محلول شستشو در دمای اتاق به مدت ۲ ماه پایدار است .

روش انجام آزمایش :

- ۱- تعداد چاهک های کوت شده برای استانداردها، کنترل و نمونه های بیمار را بصورت ۲ تایی انتخاب کنید و مابقی چاهک ها را همراه ماده آنگیر درون کیسه مخصوص قرار داده و درب آنرا ببندید.
- ۲- ۵۰ میکرولیتر از استانداردها، کنترل و نمونه های بیمار را به داخل هر چاهک بریزید.

هر آزمایشگاه باید دامنه طبیعی را برای خود به دست آورد. این مقادیر فقط برای راهنمایی داده شده است.

مردان	1.8 – 21.4 ng/ml
زنان قبل از یائسگی	4.6 – 29.5 ng/ml
زنان بعد از یائسگی	1.5 – 18.5 ng/ml

برای تبدیل واحدها به شرح ذیل می توان عمل کرد:

$$\text{ng/ml} = 0.0472 \times \text{mIU/L}$$

$$\text{mIU/L} = 21.2 \times \text{ng/ml}$$

خصوصیات کیت:

۱- حساسیت آنالیتیکال (حد تشخیص) : برای تعیین حد تشخیص ۲۰ مرتبه استاندارد صفر آزمایش شد. حد تشخیص از ۲ انحراف معیار (SD) بالاتر از میانگین جذب در غلظت صفر بدست آمد. حد تشخیص برای این کیت 1 ng/ml بدست آمد.

۲- ویژگی: واکنش متقاطع آنتی بادی های مونوکلونال مورد استفاده در این آزمایش برای hTSH، hLH و hFSH به ترتیب ۰/۱۳، ۰/۱۷ و ۰/۰۴ درصد بدست آمد. این مطالعه با اضافه کردن این پروتئین ها به استاندارد صفر به صورت دوبلیکیت و در دو سری کاری تعیین گردید.

۳- دقت: برای محاسبه میزان دقت در یک روز و روزهای مختلف، آزمایش بر روی ۳ نمونه سرم ۱۰ 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	10	57.35	2.91	5.08
2	10	12.64	1.23	9.74
3	10	4.01	0.2	5.05

ضریب تغییرات در روزهای مختلف

نمونه سرم	دفعات تکرار	میانگین (ng/ml)	انحراف معیار	ضریب تغییرات (CV)
1	10	69.93	5.18	7.4
2	10	14.09	1.28	9.1
3	10	5.24	0.45	8.6

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

نمونه سرمی	غلظت اولیه (ng/ml)	درصد بازیابی		
1	85.1	1:2	1:4	1:8
2	60.4	107	110	111
3	41.2	106	108	112

۵- اثر هوک: اثر هوک تا غلظت ۲۰۰۰ ng/ml ظاهر نمی شود.

۳- ۱۰۰ میکرولیتر از کونژوگه آنزیمی (HRP-Anti-Prolactin) را به تمام چاهک ها اضافه کنید.

۴- پلیت را بمدت ۶۰ - 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 ۳۰ دقیقه 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 ۱۵ 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 ۱۵ 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 رسم کنید.

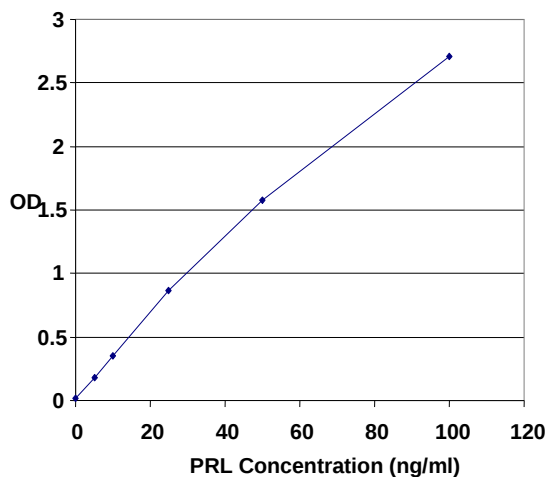
۲- میانگین جذب نوری برای هر نمونه را بدست آورده و روی محور Y جای آنرا پیدا کنید. سپس نقطه مذکور را توسط خطی به منحنی وصل کنید. از نقطه بدست آمده خطی عمود بر محور X وارد کنید تا نقطه تلاقی که نشان دهنده غلظت نمونه است، بدست آید.

۳- با استفاده از کامپیوتر این محاسبات ساده خواهد شد.

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.

No.	Prolactin Con. (ng/ml)	OD
1	0	0.02
2	5	0.18
3	10	0.35
4	25	0.87
5	50	1.58
6	100	2.71



مقادیر طبیعی