

## اندازه‌گیری هورمون استرادیول در سرم

Estradiol ELISA kit 96t cat NO: 2824-96  
Brochure Rev: 11 (1399/04/12)

### مقدمه:

استرادیول ( $17\beta$ -estradiol) یک هورمون استروئیدی ۱۸ کربنه می‌باشد که در اتصال با پروتئین‌ها در گردش خون وجود دارد. علاوه بر استرادیول (E2)، سایر استروژن‌ها نظیر استرون (E1) و استریول (E3) در خانم‌ها توسط فولیکول‌های تخمدان، جسم زرد، قشر آدرنال و جفت و در آقایان توسط بیضه ترشح می‌شوند. استرادیول از آروماتیزه شدن تستوسترون تولید می‌شود. این هورمون در خون به طور اختصاصی و با تمایل بالا به گلوبولین اتصالی به هورمون‌های جنسی و به طور غیر اختصاصی به آلبومین متصل می‌شود. ۲ تا ۳ درصد از کل مقدار این هورمون نیز به صورت آزاد در جریان خون وجود دارد. استرادیول به همراه دیگر استروژن‌ها مسئول حفظ و رشد اندام‌های جنسی زنانه و خصوصیات ثانویه جنسی در زنان می‌باشند. همچنین به همراه پروژسترون در تنظیم سیکل قاعدگی، رشد پستان و رحم و نگهداری بارداری نقش دارند. این هورمون هومئوستاز کلسیم را نیز تنظیم کرده و اثرات مفیدی بر توده استخوانی دارد. کاهش طولانی مدت استروژن‌ها با از دست رفتن محتوای معدنی استخوان و پوکی استخوان مرتبط است. همچنین استروژن‌ها غلظت پروتئین‌های اتصالی در خون نظیر TBG، SHBG، CBG و پروتئین‌های متصل شونده به آهن و مس و HDL را تغییر می‌دهند که این موضوع منجر به تغییر برخی از تست‌های هورمونی می‌شود. سنجش استرادیول جهت بررسی عملکرد تخمدان، مشکلات قاعدگی، نازایی و به عنوان تومور مارکر برای برخی از تومورهای تخمدانی انجام می‌شود. افزایش استرادیول در سندرم زن نمایی، بلوغ زودرس، تومورهای تخمدان، بیضه و آدرنال و هیپرتیروئیدی

رخ می‌دهد. کاهش این هورمون نیز در هیپوتیروئیدیزم، سندرم ترنر، هیپوگنادیسم، یائسگی و کیست‌های تخمدان رخ می‌دهد.

### اصول آزمایش:

تست سنجش ایمنی آنزیمی رقابتی تاخیری (Type 9):

در این تست از واکنش بین استرپتاویدین (Streptavidin) و بیوتین جهت اتصال آنتی‌بادی ضد استرادیول به سطح پلیت استفاده شده است. نمونه‌های سرم و کالیبراتورها که حاوی استرادیول غیر کوئزوگه هستند به همراه آنتی‌بادی ضد استرادیول بیوتینیل شده در چاهک‌ها ریخته می‌شوند. در زمان انکوباسیون اول، آنتی‌بادی بیوتینیل به استرادیول متصل می‌شود. سپس، استرادیول متصل به آنزیم HRP به چاهک‌ها اضافه می‌شود. (افزودن با تاخیر آنتی‌ژن کوئزوگه، منجر به افزایش حساسیت تست برای نمونه‌های با غلظت کم می‌شود). در زمان انکوباسیون مجدد، استرادیول کوئزوگه برای اتصال به جایگاه‌های محدود آنتی‌بادی (که در انکوباسیون اول مصرف نشده‌اند) با استرادیول موجود در نمونه رقابت می‌کند و همزمان، کمپلکس‌های ایمنی از طریق واکنش بین بیوتین و استرپتاویدین به کف پلیت متصل می‌شوند. هر چه مقدار استرادیول در نمونه‌ها بیشتر باشد، استرادیول کوئزوگه کمتری به آنتی‌بادی متصل می‌شود. پس از تخلیه و شستشوی چاهک‌ها، با اضافه کردن محلول رنگزا، محصول آبی رنگی تشکیل می‌شود که با افزودن محلول متوقف کننده، زرد رنگ می‌شود. بیشترین میزان جذب این محصول در طول موج ۴۵۰ نانومتر، می‌باشد. شدت رنگ و میزان جذب با غلظت استرادیول نمونه‌ها رابطه معکوس دارد. در نهایت سطح استرادیول نمونه‌ها توسط 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 استرادیول با غلظت های ۰، ۲۰، ۱۰۰، ۲۵۰، ۵۰۰، ۱۵۰۰ و ۳۰۰۰ pg/ml تهیه شده در سرم انسان.
۳. کوئزوگه آنزیمی استرادیول: ۱ ویال ۶ میلی‌لیتری که حاوی آنتی‌ژن متصل به آنزیم HRP در بافر است.
۴. کوئزوگه بیوتینی استرادیول: ۱ ویال ۶ میلی‌لیتری که حاوی آنتی‌بادی متصل به بیوتین در بافر است.
۵. محلول شستشو (۵۰X): ۱ ویال ۲۰ میلی‌لیتری.
۶. محلول رنگزا: ۱ ویال ۱۲ میلی‌لیتری.
۷. محلول متوقف کننده واکنش: ۱ ویال ۱۲ میلی‌لیتری.
۸. برچسب مخصوص پلیت: ۱ ورق

توجه: کلیه محلول‌ها در دمای ۲ تا ۸ درجه سانتی‌گراد نگهداری شوند. محلول 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 انقضای کیت پایدار هستند. از محلول‌هایی که تاریخ انقضای آنها گذشته است، استفاده ننمایید.
۳. توجه فرمایید محلول‌ها در مجاورت نور و گرما قرار نگیرند.
۴. محتویات این کیت با منبع انسانی از نظر منفی بودن HBsAg، HIV 1/2 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 فرمائید که محتویات به صورت یا سایر نقاط بدن نباشد 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 از سلول‌های خونی جدا گردد. از انجام تست بر روی نمونه‌های لیمیک همراه با کدورت و همولیز خودداری نمائید. 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 ۲ ماه در دمای ۲۰- درجه سانتی‌گراد نگهداری کرد.

### آماده‌سازی معرف‌ها:

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

### روش انجام آزمایش:

- قبل از شروع آزمایش اطمینان حاصل کنید که کلیه معرف‌ها و نمونه‌ها به دمای اتاق (۲۰ تا ۲۵ درجه سانتی‌گراد) رسیده‌اند. کلیه کالیبراتورها را با سر و ته کردن به آرامی مخلوط نمائید.
۱. تعداد چاهک‌های مورد نیاز برای انجام آزمایش را برداشته و بقیه چاهک‌ها را همراه رطوبت گیر در کیسه آلومینیومی قرار داده در آن را بسته و در دمای ۲ تا ۸ درجه سانتی‌گراد نگه دارید.
  ۲. ۲۵ میکرولیتر از کالیبراتورها و نمونه‌ها در چاهک‌های مورد نظر بریزید. بهتر است که از هر نمونه یا کالیبراتور به صورت (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. ۵۰ میکرولیتر کوئزوگه بیوتینی (Biotin Conjugate) به تمام چاهک‌ها اضافه کنید و پلیت را به مدت ۳۰ ثانیه روی سطح میز به آرامی تکان دهید.

### Specificity

اختصاصیت این آزمایش توسط اضافه کردن غلظت‌های مختلفی از مواد مداخله‌گر به سرم و اندازه‌گیری واکنش متقاطع آنها با استرادیول، سنجش شد.

Analyte	Cross Reactivity
Androstenedione	0.0003
Dihydrotestosterone	0.0008
Cortisone	<0.0001
Corticosterone	<0.0001
Cortisol	0.0004
Estrinol	<0.0001
DHEA-S	<0.0001
Estradiol	<0.0001
Estrone	<0.0001
Testosterone	<0.0001

### Sensitivity

بر اساس جمع میانگین جذب نوری کالیبراتور صفر و سه برابر انحراف معیار حداقل غلظت قابل تشخیص در این کیت ۸/۳ pg/ml می‌باشد.

### References:

1. Dorfman, RI Shipley, RA: Androgens, New York, John Wiley and Sons, 1956, pp. 116-128.
2. Tietz, Textbook of clinical chemistry, 2<sup>nd</sup> ed. Philadelphia: W.B. Saunders (1994).
3. Klopper A, Fuchs F. Endocrinology of Pregnancy. Hagerstown: Harper & Row. 99 -122. (1977)

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

### پارامترهای کنترل کیفی

#### Intra - Assay

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

Serum sample	1	2	3
No.of Repeats	20	20	20
Mean Estradiol (pg/ml)	37.4	138.2	234
S.D (pg/ml)	1.29	5.65	7.48
C.V (%)	3.4	4	3.2

#### 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 Estradiol (pg/ml)	25.9	114.1	216.3
S.D (pg/ml)	1.12	5.64	9.21
C.V (%)	4.3	4.9	4.2

### Recovery

در این تست دو نمونه سرم به نسبت مساوی با یکدیگر ترکیب شده و به عنوان یک نمونه، غلظت استرادیول در آن اندازه‌گیری شد.

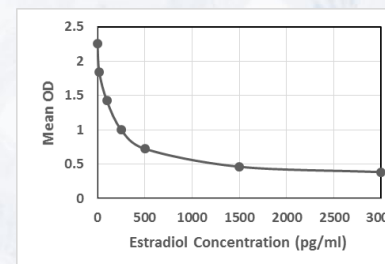
NO.	Sample (pg/ml)	Added (pg/ml)	Exp. (pg/ml)	Obs. (pg/ml)	Rec. (%)
1	23	31.5	27.2	26.5	97.4
2	15	42.7	28.8	29.2	101.4
3	58	114.6	86.3	89	103.1
4	35	227.3	131.1	127	96.8

### Linearity

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

NO.	Sample	Recovery %			
		1/2	1/4	1/8	1/16
1	133	97.2	102.1	97.2	99
2	165.4	103.5	98.8	97	96.4
3	197	98.5	103	98.3	97.4
4	257.2	98	99.1	102	98.8

Calibrator	Well Number	Abs	Mean Abs	Value (pg/ml)
Cal A	A1	2.264	2.255	0
	B1	2.247		
Cal B	C1	1.857	1.839	20
	D1	1.821		
Cal C	E1	1.436	1.424	100
	F1	1.412		
Cal D	G1	1.010	1.004	250
	H1	0.998		
Cal E	A2	0.735	0.725	500
	B2	0.715		
Cal F	C2	0.491	0.463	1500
	D2	0.435		
Cal G	E2	0.394	0.385	3000
	F2	0.376		



مقادیر مورد انتظار برای تست الایزای استرادیول

Females	-
Follicular Phase	9 - 175 pg/ml
Luteal Phase	44 - 196 pg/ml
Periovulatory	107 - 281 pg/ml
Treated Menopausal	42 - 289 pg/ml
Untreated menopausal	ND - 20 pg/ml
Oral Contraceptives	ND - 103 pg/ml
Males	4 - 49 pg/ml

۴. چاهک‌ها را با برجسب مخصوص پلیت بیوشانید و به مدت ۳۰ دقیقه در دمای اتاق انکوبه نمایید.

۵. ۵۰ میکرولیتر کونژوگه آنزیمی (Enzyme Conjugate) به هر چاهک اضافه کنید و پلیت را به مدت ۳۰ ثانیه روی سطح میز به آرامی تکان دهید.

۶. چاهک‌ها را با برجسب مخصوص پلیت بیوشانید و به مدت ۹۰ دقیقه در دمای اتاق انکوبه نمایید.

۷. محتویات چاهک‌ها را با وارونه کردن پلیت تخلیه کنید و به آرامی پلیت را بر روی دستمال رطوبت گیر بزنید. 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 رطوبت گیر بزنید.

۸. ۱۰۰ میکرولیتر از محلول رنگزا درون تمام چاهک‌ها بریزید و پلیت را به مدت ۲۰ 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 بدست آمد، می‌توانید زمان انکوباسیون محلول رنگزا را به مدت ۱۰ دقیقه افزایش دهید.

۹. ۵۰ میکرولیتر محلول متوقف کننده 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.

۱۰. مقدار جذب نوری 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 ۶۲۰ تا ۶۳۰ نانومتر استفاده شود.

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