کیت اندازه‌گیری هورمون FSH در سرم

FSH ELISA Kit 96t Cat. No: 0324-96
Brochure Rev: 06 (1399/03/12)

مقدمه:

FSH هورمونی گلیکوپروتئینی است که در بخش قدامی غده هیپوفیز با تحریک هورمون آزاد کننده گنادوتروپین (GnRH) سنتز و ترشح شده و توسط جریان خون به اندام‌های هدف (بیضه و تخمدان) منتقل می‌شود. این هورمون همانند سایر هورمون‌های گلیکوپروتئینی هیپوفیز (LH، TSH و hCG) از دو زیر واحد آلفا و بتا تشکیل شده است. زیر واحد آلفا در همه آنها یکسان است ولی زیر واحد بتا در آنها با یکدیگر متفاوت بوده و نقش اصلی را در عملکرد بیولوژیکی مولکول ایفا می‌کند. در خانم‌ها این هورمون باعث رشد فولیکول‌های تخمدان و تحریک سنتز استروئیدها می‌شود. در آقایان، FSH باعث تحریک ترشح Inhibin شده که ترشح FSH و پروتئین متصل شونده به آندروژن را مهار می‌کند. این روند به صورت غیر مستقیم باعث تقویت اسپرماتوژنز می‌گردد.

چرخه قاعدگی به دو فاز فولیکولار و لوتئال تقسیم می‌شود. با پیشرفت فاز فولیکولار، غلظت FSH کاهش می‌یابد. در هنگام تخمک گذاری، در اواسط چرخه قاعدگی، سطح FSH و LH هر دو افزایش یافته و به بیشترین میزان خود می‌رسد. البته در این فرایند پیک افزایش LH از FSH بیشتر است.

اهمیت بالینی اندازه‌گیری سطح FSH خون، ارزیابی تعادل و تنظیم چرخه قاعدگی و باروری از طریق محور هیپوتالاموس–هیپوفیز–گناد است. مقادیر بالای این هورمون در اختلالاتی نظیر یائسگی زودرس، سندرم ترنر و نارسایی بیضه دیده می‌شود. مقادیر پایین این هورمون در اختلالاتی نظیر کم‌کاری هیپوفیز و هیپوتالاموس، سندرم Kallmann، هایپرپرولاکتینمی و نارسایی‌های گنادوتروپین دیده می‌شود.

اصول آزمایش:

در این روش بی‌حرکت سازی در سطح چاهک‌های پلیت توسط واکنش بین استرپتاویدین (Streptavidin) کوت شده در سطح پلیت و آنتی‌بادی مونوکلونال ضد FSH بیوتینیله شده صورت می‌گیرد.

با مخلوط شدن آنتی‌بادی مونوکلونال بیوتینیله شده، آنتی‌بادی متصل به آنزیم HRP و سرم حاوی آنتی‌ژن، واکنش بین آنتی‌ژن سرم و آنتی‌بادی‌ها بدون هیچ رقابتی صورت می‌گیرد و کمپلکس ساندویچ محلولی ایجاد می‌شود. به موازات واکنش فوق، کمپلکس‌های ایمنی، به دلیل تمایل بسیار بالای بین استرپتاویدین و بیوتین، به سطح پلیت متصل می‌شود پس از شستشو و حذف اجزاء متصل نشده، سوبسترای آنزیم HRP (محلول رنگزا) اضافه شده و محصول آبی رنگی تشکیل می‌شود که با افزودن محلول متوقف کننده به رنگ زرد تغییر رنگ می دهد و در طول موج ۴۵۰ نانومتر بیشترین میزان جذب را دارد. شدت رنگ ایجاد شده و در نتیجه مقدار جذب با غلظت FSH سرم ارتباط مستقیم دارد. در نهایت غلظت FSH سرم به کمک منحنی استاندارد (نمودار کالیبراتورها) محاسبه می‌گردد.

محتویات کیت:

۱. میکرو پلیت Coat شده با استرپتاویدین ۹۶ تستی. بسته‌بندی شده در کیسه آلومینیومی همراه با رطوبت‌گیر.

۲. کالیبراتورهای FSH در مقادیر ۰، ۵، ۱۰، ۲۵، ۵۰ و ۱۰۰ mIU/ml ، تهیه شده در سرم انسان.

۳. کونژوگه FSH : ۱ ویال ۱۱ میلی‌لیتری که حاوی آنتی‌بادی‌های متصل به بیوتین و متصل به آنزیم HRP در بافر است.

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 متوقف کننده واکنش: ۱ ویال ۱۲ میلی‌لیتری.

۸. محلول کنترل: ۱ ویال ۰/۵ میلی‌لیتری.

۹. بر چسب 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 کیت ها 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. محتویات کیت منبع انسانی دارد. مواد مورد استفاده برای تولید این کیت از نظر منفی بودن HBsAg، HIV 1/2 و HCV تست شده‌اند. در هر حال هیچ روشی به طور کامل قادر به مشخص کردن منفی بودن موارد فوق نیست. بنابراین لازم است بالقوه آلوده در نظر گرفته شود و کار با آنها باید 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 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 خون گیری سیاهرگی انجام شود و به سرعت سرم از سلول‌های خونی جدا گردد.

۲. از انجام تست بر روی نمونه‌های لیپمیک همراه با کدورت و همولیز خودداری نمائید. نمونه‌های پلاسمای جهت انجام این تست مناسب نمی‌باشند.

۳. درب نمونه‌ها باید کاملاً بسته باشد و تا ۵ روز می‌توان آنها را در دمای ۲ تا ۸ درجه سانتی‌گراد و برای مدت طولانی تر حداکثر تا ۱ 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.

محلول رنگزا: ۱ میلی‌لیتر از محلول رنگزا A را با ۱ میلی‌لیتر از محلول رنگزا B مخلوط نمایید. محلول فوق بعد از ۱۰ دقیقه قابل استفاده و برای ۲ ردیف کافی می‌باشد.

توجه: در صورت مشاهده رنگ آبی در محلول رنگزا و یا کدورت و رشد باکتری، از این محلول استفاده نشود.

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 نمائید.

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

۲. ۵۰ میکرولیتر از کالیبراتوها، نمونه‌ها و کنترل 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. ۱۰۰ میکرولیتر از محلول آنزیم کونژوگه (Enzyme Conjugate) به هر چاهک اضافه نمایید و پلیت را به مدت ۳۰ ثانیه روی سطح میز به آرامی تکان دهید.

۴. چاهک‌ها را با برچسب مخصوص پلیت بپوشانید 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.

۶. ۱۰۰ میکرولیتر از محلول رنگزا درون تمام چاهک‌ها بریزید و پلیت را به مدت ۱۵ دقیقه در دمای اتاق و تاریکی انکوبه کنید. از تکان دادن پلیت در این مرحله خودداری کنید.

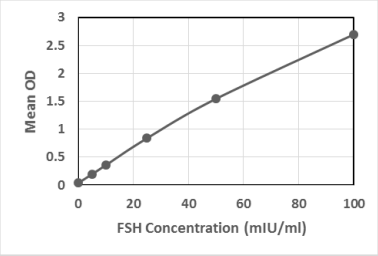
توجه: اگر بالاترین میزان جذب کالیبراتور کمتر از ۲ به دست آمد، می‌توانید زمان انکوباسیون محلول رنگزا را به مدت ۱۰ دقیقه افزایش دهید.

۷. ۵۰ میکرولیتر از محلول 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.

۸. 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 رفرانس ۶۲۰ تا ۶۳۰ 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 (mIU/ml)
Cal A	A1	0.037	0.036	0
	B1	0.036		
Cal B	C1	0.191	0.195	5
	D1	0.200		
Cal C	E1	0.359	0.356	10
	F1	0.353		
Cal D	G1	0.840	0.840	25
	H1	0.841		
Cal E	A2	1.552	1.545	50
	B2	1.539		
Cal F	C2	2.718	2.698	100
	D2	2.678		



مقادیر مورد انتظار برای تست FSH به روش الایزا

Reference Intervals	
Follicular Phase (Female)	3 – 12 mIU/ml
Midcycle Peak (Female)	8 – 22 mIU/ml
Luteal Phase (Female)	2 – 12 mIU/ml
Postmenopausal (Female)	35 – 151 mIU/ml
Male	1 – 14 mIU/ml

پارامترهای کنترل کیفی

Intra - Assay

دقت داخلی با ارزیابی تکرارپذیری سه نمونه سرم در یک نوبت تست انجام شد.

Serum sample	1	2	3
No.of Repeats	20	20	20
Mean FSH (mIU/ml)	6.8	42.1	79.3
S.D (mIU/ml)	0.17	1.52	2.7
C.V (%)	2.5	3.6	3.4

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 FSH (mIU/ml)	6.13	35	81
S.D (mIU/ml)	0.41	1.58	4.2
C.V (%)	6.7	4.5	5.2

Recovery

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

NO.	Sample (mIU/ml)	Added (mIU/ml)	Exp. (mIU/ml)	Obs. (mIU/ml)	Rec. (%)
1	12.5	22.7	17.6	17.2	97.7
2	16.8	38.2	27.5	26.85	97.6
3	65.5	19.9	42.7	42.1	98.6
4	86.4	78.6	82.5	85.4	103

Linearity

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

NO.	Sample	1/2	1/4	1/8	1/16
		Recovery %			
1	8.4	98.2	101.3	97.8	99
2	17.1	102.4	98.6	99.1	97.3
3	43	97.4	102.2	98.6	98
4	88.2	97.8	99	98.4	98.7

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 دوز ماده مداخله‌گر به دوز FSH مورد نیاز برای ایجاد همان مقدار جذب سنجش شد.

Analyte	Cross Reactivity	Concentration
FSH	1	
hLH	<0.0001	1000 ng/ml
hCG	<0.0001	1000 ng/ml
TSH	<0.0001	1000 ng/ml

Sensitivity

بر اساس جمع میانگین جذب نوری کالیبراتور صفر و سه برابر انحراف معیار حداقل غلظت قابل تشخیص در این کیت ۰/۲ mIU/ml می‌باشد.

Hook effect

غلظت FSH تا ۲۴۰۰ mIU/ml بررسی گردید و اثر هوک مشاهده نشد.

References:

1. Shome , B and Parlow A.F. :J . Clin . Endocrinal. Metab 39 , 199 (1974)
2. Cohen KL.Metabolism 26 ,1165 (1977(
3. Jeffcoate, SL. Clinic in Endocrinal . Metabl . 4 , 521 (1975)
4. Marshall , J.C,: Clinic In Endocrinal . Matab . 4 ,454 (1975)
5. Rebar , R. W. Erickson , G.G. and Yen , S.S.C. : Fertil. Steril . , 37, 35 (1982).
6. Speroff , L,: Clinic . Gynecol . Endocrinal and Infert , Chapter 3, Ed.L.Speroff, RH . Glass and M.G. Kase , William & Wilkins, Baltimore (1978)

Brochure Rev: 06 (1399/03/12)

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

www.idealdiag.com
تهران - بزرگراه آبشناسان - سردارجنگل شمالی - خیابان پنج تن - بلوار قدس - کوچه دوم شرقی - پلاک ۱۵
تلفن: ۲۳-۰۲۱۸۵۵۱۹۵۱۹