کیت اندازه گیری هورمون پروژسترون در سرم

Progesterone ELISA Kit 96t Cat. NO: 2524-96

مقدمه:

اندازه گیری سطح پروژسترون در سرم یا پلاسما، قابل اعتماد ترین روش جهت ارزیابی میزان ترشح آن است. پروژسترون یک هورمون استروئیدی ۲۱ کربنه است که نقش مهمی در آماده سازی رحم برای لانه گزینی جنین و تداوم بارداری دارد. این هورمون از کلسترول و از طریق پرگننولون سنتز می شود و پس از ترشح، به سرعت در کبد به پرگناندیول متابولیزه می گردد. محل اصلی ترشح پروژسترون در خانم های غیر باردار، جسم زرد در تخمدان می باشد ولی در زمان بارداری این هورمون به طور عمده از بافت جفت ترشح می شود. پروژسترون در مقادیر اندک توسط قشر غده آدرنال (در آقایان و خانم ها) و بیضه (در آقایان) تولید می شود. این هورمون، ناقل پلاسمایی اختصاصی ندارد. مقادیری از آن در خون به گلوبولین متصل شونده به کورتیکواستروئید (CBG) و آلبومین متصل شده و حدود ۲ تا ۱۰ درصد آن نیز به صورت آزاد در پلاسما باقی می ماند.

سطح پروژسترون موجود در گردش خون خانم های غیرباردار در فاز فولیکولار به طور مشخص کم می باشد. در زمان تخمک گذاری، افزایش ناگهانی LH، منجر به تمایز سلولهای تکا و افزایش تولید پروژسترون می شود به طوری که ۵ تا ۱۰ روز پس از تخمک گذاری، ترشح پروژسترون از جسم زرد به ۱۰ تا ۲۰ برابر مقدار قبل از آن می رسد. در صورت عدم لقاح تخمک و بارداری، ترشح پروژسترون حدود چهار روز قبل از سیکل قاعدگی بعدی به شدت کاهش یافته و به سطح آن در فاز فولیکولی می رسد. این الگوی تغییرات، جهت تعیین زمان تخمک گذاری در طول دوره قاعدگی کاربرد دارد. همچنین با توجه به اینکه سطح پروژسترون در طی دوران حاملگی به دلیل تولید جفتی به طور پیشرونده افزایش می یابد، اندازه گیری میزان آن جهت ارزیابی وضعیت جفت در حاملگی های پرخطر، به صورت سریالی انجام می شود. امروزه سنجش پروژسترون در افراد با نقص فاز لوتئال دوره قاعدگی جهت حفظ جنین در ابتدای بارداری انجام می گیرد. افزایش سطح پلاسمایی پروژسترون در تخمک گذاری، بارداری، کیست های لوتئالی تخمدان، هیپر آدرنوکورتیکالیسم، کوریوکارسینوم تخمدان و هایپرپلازی آدرنوکورتیکال دیده می شود. کاهش مقدار پروژسترون خون نیز، در پره اکلامپسی، مسمومیت حاملگی، حاملگی نابجا، نارسایی جفت، آمنوره و کاهش عملکرد تخمدان ها گزارش شده است.

اصول آزمایش:

تست سنجش ایمنی آنزیمی رقابتی (Type 7):

در این تست، از واکنش بین استرپتوآویدین و بیوتین جهت اتصال و بی حرکت کردن آنتی بادی ضد پروژسترون به سطح پلیت استفاده شده است. نمونه های سرم و کالیبراتور ها که حاوی پروژسترون آزاد و غیر کونژوگه هستند به همراه پروژسترون کونژوگه با آنزیم HRP در چاهک ها ریخته می شوند. رقابت بین دو آنتی ژن برای اتصال به آنتی بادی ضد پروژسترون بیوتینیله شده که به استرپتوآویدین کف پلیت متصل شده است، باعث می شود، هرچه مقدار پروژسترون نمونه بیشتر باشد، پروژسترون کونژوکه کمتری به آنتی بادی متصل شود. پس از تخلیه و شستشوی چاهک ها، محلول رنگزا اضافه می شود که منجر به پدیدار شدن رنگ آبی می شود و با افزودن محلول متوقف کننده به رنگ زرد تغییر رنگ می دهد که در طول موج ۴۵۰ نانومتر، بیشترین میزان جذب را دارد. شدت رنگ و میزان جذب با غلظت پروژسترون نمونه و استاندارد ها، نسبت معکوس دارد.

محتویات کیت:

۱. میکرو پلیت Coat شده با استرپتاویدین. ۹۶ تستی بسته بندی شده در کیسه آلومینیومی همراه با رطوبت گیر.

۲. کالیبراتور های پروژسترون در مقادیر ۰، ۰/۳، ۲، ۵، ۱۵، ۳۰ و ۶۰ ng/ml، تهیه شده در سرم انسان.

۳. کونژوگه آنزیمی پروژسترون: ۱ ویال ۶ میلی لیتری حاوی آنتی ژن متصل به آنزیم HRP در بافر.

۴. کونژوگه بیوتینی پروژسترون: ۱ ویال ۶ میلی لیتری حاوی آنتی بادی متصل به بیوتین در بافر.

۵. محلول شستشو (۵۰ x): ۱ ویال ۲۰ میلی لیتری.

۶. محلول رنگزا : ۱ ویال ۱۲ میلی لیتری.

۷. محلول متوقف کننده واکنش: ۱ ویال ۱۲ میلی لیتری.

۸. برچسب مخصوص پلیت.

توجه: کلیه محلول ها 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 شده است. لذا از استفاده مشترک با سایر کیت ها و یا شماره های ساخت دیگر جدا خودداری نمایید.

۲. محتویات این کیت منبع انسانی دارد. با وجود اینکه محتویات آن از نظر منفی بودن HBsAg، HIV ۱/۲ و HCV تست شده اند 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 شوند و کار با آنها طبق دستورا لعمل های ایمنی انجام شود.

۳. استفاده از دستکش و عینک در هنگام کار الزامی است.

۴. 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.

جمع آوری و آماده سازی نمونه:

۱. سرم یا پلاسمای هپارینه تهیه شده از نمونه خون صبحگاهی در حالت ناشتا برای این تست مناسب می باشد.

۲. گرفتن خون باید توسط تکنیک استاندارد خون گیری سیاهرگی انجام شده و به سرعت سرم از سلولهای خونی جدا گردد. از انجام تست بر روی نمونه های لیپمیک همراه با کدورت و همولیز خودداری نمائید.

۳. درب ظروف نمونه باید کاملا بسته باشد. نمونه های سرم تا ۵ روز در دمای ۲ تا ۸ درجه سانتی گراد و به مدت ۳۰ روز در دمای ۲۰- درجه سانتی گراد پایدار هستند.

۴. برای رقیق کردن نمونه های بالاتر از ۶۰ ng/ml از استاندارد صفر یا سرم نرمال مرد (progesterone = 0 ng/ml) به عنوان رقیق کننده استفاده شود.

آماده سازی معرف ها:

محلول شستشو: کل محتویات محلول شستشو(۵۰x) را با ۹۸۰ میلی لیتر آب مقطر مخلوط کنید.

روش انجام آزمایش:

قبل از شروع آزمایش اطمینان حاصل کنید که کلیه استانداردها، معرف ها و نمونه ها به دمای اتاق (۲۵-۲۰ درجه سانتیگراد) رسیده اند. کلیه استاندارد ها را با سر و ته کردن به آرامی مخلوط نمائید.

۱. تعداد چاهک های مورد نیاز برای انجام آزمایش را برداشته و بقیه چاهک ها را همراه رطوبت گیر در کیسه آلومینیومی قرار داده درب آن را بسته و در دمای ۲ تا ۸ درجه سانتی گراد نگهدارید.

۲. ۲۵ میکرولیتر از کالیبراتور ها و نمونه ها در چاهک های مورد نظر بریزید. بهتر است که از هر نمونه یا استاندارد به صورت دوتایی (Duplicate) در چاهک ها ریخته شود.

۳. ۵۰ میکرولیتر از محلول کونژوگه آنزیمی (Enzyme Conjugate) به هر چاهک اضافه کنید و پلیت را به مدت ۳۰ ثانیه روی سطح میز به آرامی تکان دهید.

۴. ۵۰ میکرولیتر از محلول کونژوگه بیوتین (Biotin Conjugate) به هر چاهک اضافه کنید و پلیت را به مدت ۳۰ ثانیه روی سطح میز به آرامی تکان دهید.

۵. چاهک ها را با برچسب مخصوص پلیت بپوشانید و به مدت ۶۰ دقیقه در دمای اتاق انکوبه نمایید.

۶. محتویات چاهک ها را با وارونه کردن پلیت تخلیه کنید. سپس چاهک ها را ۵ مرتبه و هر مرتبه با ۳۰۰ میکرولیتر محلول شستشو بشویید. اگر شستشو به صورت دستی انجام می شود در انتهای شستشو به آرامی پلیت را بر روی دستمال رطوبت گیر بزنید.

۷. ۱۰۰ میکرولیتر از محلول رنگزا درون تمام چاهک ها بریزید و . پلیت را به مدت ۲۰ دقیقه در دمای اتاق و تاریکی انکوبه کنید.

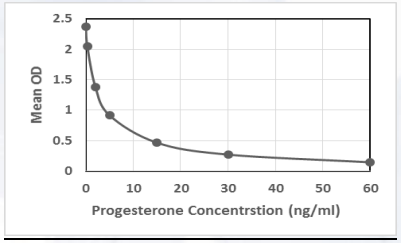
توجه: اگر بالاترین میزان جذب کالیبراتور کمتر از ۲ به دست آمد، می توانید زمان انکوباسیون محلول رنگزا را به مدت ۱۰ دقیقه افزایش دهید.

۸. ۵۰ میکرولیتر محلول متوقف کننده واکنش به کلیه چاهک ها 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 رفرانس ۶۲۰ تا ۶۳۰ نانومتر استفاده کنید.

جذب نوری و منحنی استاندارد این کیت به عنوان نمونه در زیر آورده شده است.

Sample	Well Number	Abs	Mean Abs	Value (ng/ml)
Cal A	A1	2.271	2.364	0
	B1	2.457		
Cal B	C1	1.974	2.052	0.3
	D1	2.130		
Cal C	E1	1.317	1.384	2
	F1	1.451		
Cal D	G1	0.865	0.916	5
	H1	0.967		
Cal E	A2	0.446	0.468	15
	B2	0.490		
Cal F	C2	0.259	0.273	30
	D2	0.287		
Cal G	E 2	0.141	0.147	60
	F 2	0.153		



مقادیر مورد انتظار برای تست الایزای پروژسترون

Reference	Interval
کودکان قبل از بلوغ	0.07 – 0.52 ng/ml
مردان بالغ	0.13 – 1.22 ng/ml
زنان بالغ	
فاز فولیکولار	0.15 – 1.40 ng/ml
فاز لوتئال	2 – 25 ng/ml
زنان باردار	
سه ماهه اول بارداری	7.25 – 90 ng/ml
سه ماهه دوم بارداری	19.5 – 91 ng/ml
سه ماهه سوم بارداری	49 – 422 ng/ml
زنان یائسه	0 – 0.8 ng/ml

پارامتر های کنترل کیفی

Intra- Assay

دقت داخلی با ارزیابی تکرارپذیری سه نمونه سرمی در یک نوبت تست انجام گردید.

Serum sample	1	2	3
No.of Repeats	20	20	20
Mean Progesterone (ng/ml)	1.34	27.2	85.7
S.D.(ng/ml)	0.06	0.98	3.65
C.V(%)	4.5	3.6	4.2

Inter- Assay

ارزیابی دقت بین تستی با سه نمونه متفاوت سرمی در ۳ نوبت هر نوبت ۵ بار انجام پذیرفت. تغییرات بین تستی به صورت زیر ارائه می شود.

Serum sample	1	3	4
No.of Repeats	15	15	15
Mean Progesterone (ng/ml)	3.1	18.9	77.5
S.D.(ng/ml)	0.18	0.86	4.43
C.V(%)	5.8	4.5	5.7

Recovery

در این تست دو نمونه سرمی به نسبت مساوی با یکدیگر ترکیب شده و به عنوان یک نمونه غلظت پروژسترون در آن اندازه گیری می شود.

NO.	Sample ng/ml	Added ng/ml	Exp. ng/ml	Obs. ng/ml	Rec. %
1	0.9	6.5	3.5	3.85	104
2	3.4	18.3	10.85	10.46	96.4
3	11.1	87.2	49.15	48.12	97.9
4	21.6	64.7	43.15	44.65	103.5

Linearity

در این تست غلظت پروژسترون در رقت های مختلف نمونه سرمی برای تعیین خطی بودن کیت اندازه گیری می شود.

NO.	Sample	1/2	1/4	1/8	1/16
		Recovery %			
1	4.3	98.1	102	98	100
2	13.7	97	98.4	101.2	98.1
3	31.6	99.3	96.9	96.8	97.7
4	68.2	103.4	97.3	97	98.5

اختصاصیت آزمایش:

اختصاصیت این آزمایش با کمک اضافه کردن غلظت های مختلفی از مواد مداخله گر به سرم، مورد سنجش قرار گرفت.واکنش متقاطع با اندازه گیری نسبت بین دوز ماده مداخله گر به مقدار پروژسترون مورد نیاز برای ایجاد همان مقدار جذب، سنجش شد.

Hormon	Cross Reactivity
progesterone	100.000
Androstenedione	0.158
17OH-Progesterone	0.375
Cortisone	0.014
Corticosterone	0.347
Cortisol	0.005
Danazol	0.003
Dihydrotestosterone	0.006
DHEA sulfate	0.002
Estradiol	0.004
Estrone	0.003
Estriol	0.002
Prednisone	0.023
Testosterone	0.015

حساسیت آزمایش:

بر اساس جمع معدل جذب نوری استاندارد صفر و سه برابر انحراف معیار حداقل غلظت قابل تشخیص در این کیت ۰/۱۲ ng/ml می باشد.

Referance:

1. Abraham GE.The application of natural steroid radioimmunoassay to gynecologic endocrinology.
2. Aufrere MB,Benson H.Progesterone: an overview and recent advances. ,65:783-800(1976)
3. Bauman J,Basal body temperature:unreliable method of ovulation detection , 36:729-33(1981).

Brochure Rev: 09 (1398/11/27)

در صورت بروز هرگونه مشکل خواهشمند است با تلفن های 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