کیت الایزا برای تعیین غلظت تام هورمون تستوسترون انسانی

(۹۶ تستی)

Human Total Testosterone ELISA Kit

مقدمه

تستوسترون یک استروئید ۱۹ کربنی است که دارای یک پیوند دوگانه در بین کربن ۴ و ۵، یک گروه کتونی در کربن ۳ و یک گروه هیدروکسیل در موقعیت بتای کربن ۱۷ می باشد. این هورمون استروئیدی دارای وزن ملکولی ۲۸۸/۴ است.

تستوسترون مهمترین هورمون آندروژن است که بداخل خون ترشح می شود. در مردان، تستوسترون عمدتا توسط سلول های لیدیگ (leydig) بیضه ها ترشح می شود، اما در زنان، حدود ۵۰ درصد از تستوسترون جریان خون از تبدیل محیطی آندروستن دیون مشتق می شود، حدود ۲۵ درصد از تخمدان و ۲۵ درصد از غدد آدرنال ترشح می گردد.

این هورمون مسئول بروز صفات ثانویه در مردان است که اندازه گیری غلظت آن می تواند در ارزیابی سلامت غدد جنسی موثر باشد. همچنین اندازه گیری آن، در زنان می تواند به تشخیص برخی ناهنجاری ها کمک نماید.

اساس روش اندازه گیری

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

معرف ها

۱- میکروپلیت پوشش داده شده: شامل ۹۶ چاهک جداشدنی که با آنتی بادی ضد تستوسترون تهیه شده در گوسفند پوشش داده شده اند.

۲- کونژوگه آنزیمی (HRP-Testosterone) : دو ویال ۱۲ میلی لیتری آماده مصرف.

۳- استانداردها : ۷ ویال یک میلی لیتری از استاندارد با غلظت های تستوسترون ۰، ۰/۵، ۱، ۲/۵ ، ۵، ۱۰و ۲۰ 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 رفرانس.

۴- کاغذ جاذب رطوبت

۵- انکوباتور ۱ ± ۳۷ 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 شدیدا همولیزه و دارای چربی باید حذف شوند.

۲- نمونه ها را می توان برای پنج 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 خوداری 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 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 کونژوگه آنزیمی (HRP- Testosterone) 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 د ادن 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

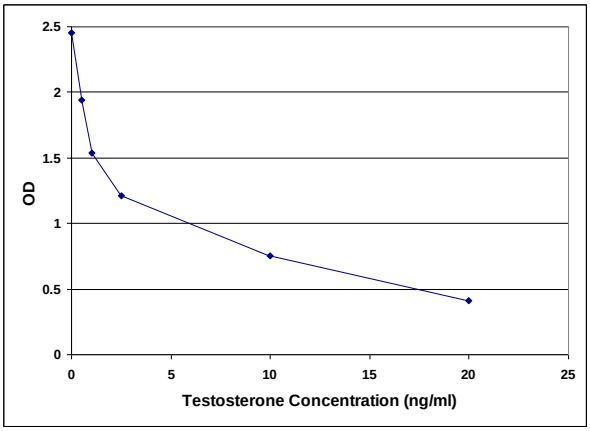
۱- با استفاده از میانگین جذب نوری استانداردها (محور Y) و غلظت مشخص آنها (محور X) برروی کاغذ میلی متری، منحنی استانداردی رسم کنید.

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	2.45
2	0.5	1.61
3	1.0	1.32
4	2.5	1.15
5	5.0	0.88
6	10.0	0.62
7	20.0	0.42



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

کودکان	0.1 – 0.2 ng/ml
بزرگسالان	3.0 – 10.0 ng/ml

۲- زنان

کودکان	0.1 – 0.2 ng/ml
بزرگسالان	0.2 – 0.9 ng/ml
یائسگی	0.08 – 0.35 ng/ml

برای تبدیل واحدها به شرح ذیل می توان عمل کرد:

ng/ml × 3.468 = nmol/L

خصوصیات کیت

۱- حساسیت

با رقیق سازی متوالی استاندارد ۰/۵ با سرم صفر، حساسیت این کیت برای تعیین مقدار هورمون تستوسترون برابر ng/ml ۰/۱ 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	1.4	0.10	7.2
2	20	6.2	0.31	5.0
3	20	12.3	0.59	4.8

ضریب تغییرات در روزهای مختلف

نمونه سرم	دفعات تکرار	میانگین (ng/ml)	انحراف معیار	ضریب تغییرات (CV)
1	10	1.8	0.15	8.5
2	10	6.7	0.42	6.2
3	10	13.2	0.59	4.5

۳- ویژگی

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

نوع ماده	غلظت (ng/ml)	درصد تداخل
تستوسترون		۱۰۰
دی هیدروتستوسترون	۱۰۰	۰/۸۷
پروژسترون	۵۰۰	۰/۰۷
استرادیول	۱۰۰۰	۰/۰۸

۴- خطی بودن

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

نمونه سرمی	غلظت اولیه (ng/ml)	درصد بازیابی		
		۱:۲	۱:۴	۱:۸
۱	۱/۴	۱۰۸/۵	۱۰۲/۷	۱۰۱/۳
۲	۲/۷	۹۹/۶	۹۸/۶	۱۰۱/۹
۳	۵/۶	۹۹/۳	۹۷/۹	۹۶/۳

منابع

1. Chen A., Bookstein J.J., Meldrum D.R. Diagnostic of a testosterone secreting adrenal adenoma by selective venous catheterization. Fertil. Steril. 55: 1202 – 1203, 1991.
2. Kessel B., Liu J. Clinical and laboratory evaluation of hirsutism. Clin Obstet Gynecol. 34: 805 – 816, 1991.
3. Azziz R., Bradley E.L., Potter H.D., Parker C.R., Boot L.R. Chronic hyperinsulinemia and the adrenal androgen response to acute corticotrophin stimulation in hypeandrogenic woman. Am. J. Obstet Gynecol. 172: 1251 – 1256, 1995.