کیت اندازه‌گیری هورمون پرولاکتین (PRL) در سرم انسان

PRL ELISA Kit 96t Cat. No: 0624-96
Brochure Rev: 06 (1399/04/15)

مقدمه:

پرولاکتین یک هورمون پپتیدی با حدود ۲۰۰ آمینواسید است. این هورمون یک پلی‌پپتید تک‌زنجیره‌ای با ساختاری شبیه به هورمون رشد می‌باشد که توسط سلول‌های لاکتوتروپ در هیپوفیز قدامی سنتز و ترشح می‌شود. همچنین این هورمون در بافت‌های دیگر مانند پستان و دیواره رحم نیز ساخته می‌شود. افزایش میزان پرولاکتین خون منجر به کاهش میزان تولید هورمون‌های جنسی (استروژن در زنان و تستوسترون در مردان) و همچنین کاهش میزان تولید FSH و LH در هیپوفیز قدامی می‌گردد.

مهمترین نقش پرولاکتین در غدد پستان، رشد این غدد و تولید شیر می‌باشد. میزان پرولاکتین در دوران حاملگی افزایش یافته و در نتیجه باعث بلوغ غدد شیری و افزایش تولید شیر می‌شود. البته میزان بالای پروژسترون در این دوران، مانع از ترشح شیر می‌شود. بلافاصله پس از زایمان و خروج جفت، مقدار پروژسترون کاهش یافته که این امر منجر به شروع ترشح شیر می‌گردد.

اهمیت بالینی اندازه‌گیری این هورمون، تشخیص هایپرپرولاکتینمی و پیگیری درمان آن می‌باشد.

مقادیر پایین پرولاکتین مربوط به بیماری جوع (Blimia) و افزایش دوپامین است. همچنین مقادیر بالای پرولاکتین در خون می‌تواند به دنبال افزایش هورمون آزاد کننده تیروتروپین TRH در مراحل اولیه هیپوتیروئیدیسم و یا به دنبال اثرات جانبی داروهای روان درمان باشد.

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

محتویات کیت:

۱. میکروپلیت Coat شده با استرپتاویدین 96 تستی بسته‌بندی شده در کیسه آلومینیومی همراه با رطوبت‌گیر.

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

۳. کونژوگه PRL: 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 کیت‌ها 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.

۲. محتویات کیت منبع انسانی دارد. مواد مورد استفاده برای تولید این کیت 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.

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.

جمع‌آوری و آماده‌سازی نمونه:

۱. گرفتن خون باید با استفاده از تکنیک استاندارد خون‌گیری سیاهرگی انجام شود و به سرعت سرم جدا گردد.

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

۲. درب نمونه‌ها باید کاملا بسته باشد و تا ۳ روز می‌توان آنها را در دمای ۲ تا ۸ درجه سانتی‌گراد و برای مدت طولانی‌تر حد اکثر تا ۱ ماه در دمای ۲۰- درجه سانتی‌گراد نگهداری کرد.

آماده سازی معرف ها:

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 آزمایش 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 رطوبت‌گیر در کیسه آلومینیومی قرار داده درب آن را بسته و در دمای ۲ تا ۸ درجه سانتی‌گراد نگه دارید.

۲. ۲۵ میکرولیتر از کالیبراتورها، 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 محلول آنزیم کونژوگه (Enzyme Conjugate) به همه چاهک‌ها 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 پلیت را با وارونه کردن تخلیه کنید. سپس 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

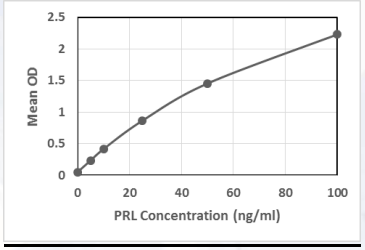
توجه: اگر بالاترین میزان جذب کالیبراتور کمتر از ۲ به دست آمد، می‌توانید زمان انکوباسیون محلول رنگزا را به مدت ۱۰ دقیقه افزایش دهید.

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.

Calibrator	Well Number	Abs	Mean Abs	Value (ng/ml)
Cal A	A1	0.049	0.05	0
	B1	0.051		
Cal B	C1	0.231	0.234	5
	D1	0.237		
Cal C	E1	0.409	0.416	10
	F1	0.423		
Cal D	G1	0.857	0.866	25
	H1	0.875		
Cal E	A2	1.448	1.454	50
	B2	1.460		
Cal F	C2	2.219	2.231	100
	D2	2.243		



مقادیر مورد انتظار برای تست PRL به روش الایزا

Reference Interval	ng/ml
Premenopausal Female	1.2 – 19.5
Postmenopausal Female	1.5 – 18.5
Adult Male	1.8 – 17

پارامترهای کنترل کیفی

Intra - Assay

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

Serum sample	1	2	3
No. of Repeats	20	20	20
Mean PRL (ng/ml)	5.3	11.8	23.4
S.D (ng/ml)	0.22	0.57	0.85
C.V (%)	4.1	4.8	3.6

Inter - Assay

ارزیابی دقت بین‌تستی با سه نمونه متفاوت سرم در ۳ نوبت هر نوبت ۵ بار انجام شد.

Serum sample	1	2	3
No. of Repeats	12	12	12
Mean PRL (ng/ml)	4.9	14.5	29.4
S.D (ng/ml)	0.23	0.75	1.58
C.V (%)	4.7	5.2	5.4

Recovery

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

NO.	Sample (ng/ml)	Added (ng/ml)	Exp. (ng/ml)	Obs. (ng/ml)	Rec. (%)
1	9.4	7.2	8.3	8.6	103.6
2	12.7	18.3	15.5	16.1	103.8
3	25.9	19.4	22.6	21.4	94.7
4	59.7	38.7	49.2	48.3	98.1

Linearity

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

NO.	Sample	1/2	1/4	1/8	1/16
		recovery %			
1	19.3	99.3	98.4	98	97.6
2	26.8	98.5	97.2	98.6	99.3
	37.9	97.4	102.4	98	98
3	49.7	101.2	98.1	102.2	97.1

Specificity

اختصاصیت این تست توسط اضافه کردن غلظت‌های مختلفی از مواد مداخله‌گر به سرم مورد سنجش قرار گرفت. واکنش متقاطع با اندازه‌گیری نسبت بین دوز ماده مداخله‌گر به دوز PRL مورد نیاز برای ایجاد همان مقدار جذب سنجش شد.

Analyte	Cross Reactivity	Concentration (ng/ml)
PRL	1	-
TSH	<0.0001	1000
LH	<0.0001	1000
FSH	<0.0001	1000
GH	<0.0001	1000
Chorionic Gonadotropin (CG)	<0.0001	1000

Sensitivity

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

Hook effect

غلظت PRL تا ۲۳۰۰ ng/ml بررسی گردید و اثر هوک مشاهده نشد.

References:

1. Clinical Guide to Laboratory Tests 3rd Edition. Edited by Norbert W. Tietz pp. 410 .W.B. Saunders Company, (1995).
2. Uotila, M. Ruouslahi, E.and Engvall, E. J. Immunol. Methods, 42, 11-15. (1981).
3. Engvall, E. Methods in Enzymology ", Volume 70 (1980).
4. VanVunakis H. and Langone, J.J. (eds). Academic Press, New York, NY, 419-492 (1980).
5. Shome, B and Parlow, A.F., J. Clin. Endocrinal. Metab. 45, 1112-1115, (1977).
6. Niall, M.D. et al, "The Chemistry of Growth Hormon and the Lactogenic Hormones"; Recent Progr. Horm. (1973).

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