کیت اندازه گیری Free-PSA در سرم انسان

Free-PSA ELISA Kit 96t Cat. No: 3924-96

مقدمه:

PSA، گلیکوپروتئینی است که به میزان زیاد در لومن پروستات یافت می شود. موانع قابل توجهی نظیر بافت غده‌ای پروستات و ساختارهای عروقی، بین لومن پروستات و جریان خون قرار دارند. این موانع حفاظتی با ایجاد بیماری هایی نظیر سرطان پروستات، عفونت و هیپرتروفی خوش خیم از بین می روند که منجر به افزایش سطح PSA در خون می شود.

سطوح افزایش یافته PSA سرم، با سرطان پروستات ارتباط دارد. مقادیر بیش از ng/ml ۴ در بیش از ۸۰ درصد مردان با سرطان پروستات یافت می شود. هر چه حجم تومور بیشتر باشد، سطح PSA سرم هم بیشتر خواهد بود. سنجش PSA همچنین یک تست حساس برای پایش پاسخ به درمان می باشد. جراحی موفق، پرتو درمانی یا هورمون درمانی با کاهش قابل توجه سطح سرمی PSA همراه است. افزایش قابل توجه PSA متعاقبا بر عود سرطان پروستات دلالت دارد. البته افزایش سطح PSA در برخی از مبتلایان به سرطان پروستات اولیه رخ نمی دهد و همچنین مقادیر PSA بیشتر از ng/ml ۴ نیز همواره با سرطان همراه نیست.

PSA در خون به دو شکل آزاد (fPSA) و فرم متصل به مولکول پروتئینی (cPSA) وجود دارد که در مجموع، PSA توتال (tPSA) نامیده می شود. در هایپرپلازی خوش خیم پروستات (BPH)، بیشتر فرم آزاد PSA در خون افزایش میابد، در حالی که در سرطان پروستات، فرم متصل بیشتری تولید می شود. درصد PSA آزاد (%fPSA) با سرطان پروستات ارتباط معکوس دارد.

$$\%fPSA = (fPSA/tPSA) * 100$$

مطالعات نشان می دهند که %fPSA مارکر بهتری جهت تشخیص سرطان پروستات در بیماران با tPSA بین ۴ تا ۱۰ ng/ml بوده و حتی استفاده از آن جهت پیش بینی بروز سرطان پروستات در افرادی که tPSA آنها کمتر از ng/ml ۴ باشد نیز موثر است. %fPSA کمتر از ۶٪ نشاندهنده سرطان پروستات و بیش از ۲۳٪ معمولا با BPH همراه است.

اصول آزمایش:

در این روش بی حرکت سازی در سطح چاهک های پلیت توسط واکنش بین استرپتاویدین کوت شده در سطح پلیت و آنتی بادی مونوکلونال ضد fPSA بیوتینیله شده که به چاهک ها اضافه می شود، صورت می گیرد. با مخلوط شدن آنتی بادی منوکلونال بیوتینیله شده، آنتی بادی متصل به آنزیم و سرم حاوی آنتی ژن، واکنش بین آنتی ژن و آنتی بادی ها بدون هیچ رقابتی صورت می گیرد و کمپلکس ساندویچی محلولی ایجاد می شود.

به موازات واکنش فوق، کمپلکس ساندویچی ایجاد شده به دلیل تمایل بسیار بالای بین استرپتاویدین و بیوتین به سطح پلیت متصل می شود. پس از به تعادل رسیدن واکنش، آنتی بادی ها و آنتی ژن های متصل نشده با آسپیره کردن تخلیه می شوند. میزان کمپلکس های ساندویچ و فعالیت آنزیم به صورت مستقیم با غلظت fPSA سرم، ارتباط دارد. پس از شستشوی چاهک ها، محلول رنگزا درون آنها ریخته شده که سوبسترای آنزیم HRP است و محصول ایجاد شده دارای رنگ آبی می باشد و پس از اضافه کردن محلول متوقف کننده به رنگ زرد تغییر رنگ می دهد که در طول موج ۴۵۰ نانومتر بیشترین میزان جذب را دارد. شدت رنگ ایجاد شده و در نتیجه مقدار جذب با غلظت fPSA سرم ارتباط مستقیم دارد. در نهایت غلظت fPSA سرم به کمک منحنی استاندارد (نمودار کالیبراتورها) محاسبه می گردد.

محتویات کیت:

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

۲. استانداردهای free-PSA در مقادیر ۰، ۰/۵، ۱، ۲/۵، ۵ و ۱۰ ng/ml ، تهیه شده درسرم انسان.

۳. کونژوگه آنزیمی free-PSA : ۱ ویال ۱۱ میلی لیتری که حاوی آنتی بادی متصل به آنزیم HRP و آنتی بادی متصل به بیوتین در بافر است.

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

۵. محلول رنگزا A: ۱ویال ۶/۵ میلی لیتری.

۶. محلول رنگزا B: ۱ویال ۶/۵ میلی لیتری.

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

۸ بر چسب 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 گردیده لذا از استفاده مشترک با سایر کیت ها و یا شماره های ساخت دیگر جدا خودداری نمایید.

۲. محتویات کیت منبع انسانی دارد. مواد مورد استفاده در این کیت از نظر منفی بودن HBsAg، HIV1/2 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 شود و کار با آنها طبق دستورالعمل های ایمنی انجام شود.

۳. استفاده از دستکش و عینک در هنگام کار الزامی است و در هنگام کار دقت فرمائید که محتویات به صورت یا سایر نقاط بدن نپاشد و از تماس با دهان و سایر مخاط جداً خودداری گردد.

جمع آوری و آماده سازی نمونه:

۱. گرفتن خون باید با استفاده از تکنیک استاندارد خون گیری سیاهرگی انجام شود و به سرعت سرم از سلول های خونی جدا گردد.

۲. از انجام تست بر روی نمونه های لیپمیک همراه با کدورت و همولیز خودداری نمائید. نمونه های پلاسمای تهیه شده با EDTA، هپارین و اگزالات به دلیل احتمال ایجاد تداخل در این تست مناسب نمی باشند.

۳. درب ظروف نمونه باید کاملا بسته باشد و تا ۳ روز می توان آنها را در دمای ۲ تا ۸ درجه سانتی گراد و برای مدت طولانی تر حد اکثر تا ۱۵ روز در دمای ۲۰- درجه سانتی گراد نگهداری کرد.

آماده سازی معرف ها

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

محلول رنگزا: ۱ میلی لیتر از محلول رنگزا A را با ۱ میلی لیتر از محلول رنگزا B مخلوط نمایید. محلول فوق پس از ۱۰ دقیقه قابل استفاده و برای ۲ ردیف کافی می باشد.

روش انجام آزمایش:

قبل از شروع آزمایش باید کلیه استاندارد ها، معرف ها و نمونه ها به دمای اتاق (۲۵-۲۰ درجه سانتیگراد) برسند.

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 ودر دمای ۲ تا ۸ درجه سانتیگراد نگهدارید.

۲. ۵۰ میکرولیتر از استاندارد و نمونه در چاهک های مورد نظر بریزید. بهتر است که از هر نمونه یا استاندارد به صورت دوتایی (Duplicate) در چاهک ها ریخته شود.

توجه: حتماً چاهک اول به عنوان بلانک در نظر گرفته شود. در این چاهک، نمونه و یا استاندارد ریخته نشود. بقیه مراحل با سایر چاهک ها یکسان می باشد.

۳. ۱۰۰ میکرولیتر از محلول کونژوگه آنزیمی (Enzyme Conjugate) به هر چاهک اضافه کنید. پلیت را به مدت ۳۰ ثانیه روی سطح میز به آرامی تکان دهید.

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

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

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

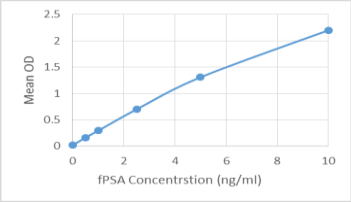
توجه: اگر بالاترین میزان جذب نوری کالیبراتور کمتر از ۲ به دست آمد، می توانید زمان انکوباسیون محلول رنگزا را به مدت ۱۰ دقیقه افزایش دهید.

۷. 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.

۸. مقدار جذب را برای هر چاهک در طول موج ۴۵۰ نانومتر با استفاده از متد Point to Point حداکثر تا ۳۰ دقیقه بعد از متوقف کردن واکنش بخوانید.

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	0.018	0.019	0
	B1	0.021		
Cal B	C1	0.165	0.162	0.5
	D1	0.160		
Cal C	E1	0.290	0.295	1
	F1	0.301		
Cal D	G1	0.695	0.699	2.5
	H1	0.703		
Cal E	A2	1.295	1.308	5
	B2	1.321		
Cal F	C2	2.186	2.200	10
	D2	2.214		



مقادیر مورد انتظار برای تست الایزای free - PSA

Expected value	
مردان سالم	≤ 1.3 ng/ml

پارامتر های کنترل کیفی

Intra- Assay

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

Serum sample	1	2	3
No.of Repeats	20	20	20
Mean fPSA ng/ml	0.68	3.7	9.85
S.D.(ng/ml)	0.03	0.19	0.46
C.V(%)	4.4	5.1	4.6

Inter- Assay

ارزیابی دقت بین تستی با سه نمونه متفاوت سرم در ۳ نوبت هر نوبت ۵ بار انجام شد. تغییرات بین تستی به صورت زیر می باشد.

Serum sample	1	2	3
No.of Repeats	15	15	15
Mean fPSA ng/ml	0.76	4.5	8.4
S.D.(ng/ml)	0.05	0.26	0.47
C.V(%)	6.5	5.7	5.6

Recovery

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

NO.	Sample ng/ml	Added ng/ml	Exp. ng/ml	Obs. ng/ml	Rec. %
1	1.3	10.2	5.75	5.7	99
2	12.1	1.2	6.65	6.5	98
3	0.5	9.5	5	5.15	100.3

Linearity

در این تست غلظت fPSA 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	2.3	99	97.4	98	97
2	5.8	100	99.2	97.6	98.3
3	9.3	98.2	98.5	101.2	97.9

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 مقدار ماده مداخله گر به مقدار fPSA مورد نیاز برای ایجاد همان مقدار جذب، سنجش شد.

Analyte	Cross Reactivity
AFP	10 µg/ml
Atropine	100 µg/ml
Acetylsalicylic acid	100 µg/ml
Ascorbic acid	100 µg/ml
Caffeine	100 µg/ml
Dexamethasone	10 µg/ml
Flutamide	100 µg/ml
hCG	100 IU/ml
hLH	100 IU/ml
Methotrexate	100 µg /ml
Prolactin	100 µg /ml
TSH	100 mIU /ml

حساسیت آزمایش:

بر اساس جمع میانگین جذب نوری استاندار صفر و سه برابر انحراف معیار حداقل غلظت قابل تشخیص در این کیت ng/mL ۰/۰۱ می باشد.

Referance:

1. Pagana KD. Mosby's manual of diagnostic and laboratory tests. Elsevier Health Sciences; 2013 Nov 8.
2. Salameh WA, Redor-Goldman MM, Clarke NJ, Reitz RE, Caulfield MP. Validation of a total testosterone assay using high-turbulence liquid chromatography tandem mass spectrometry: total and free testosterone reference ranges. Steroids. 2010 Feb 28;75(2):169-75.
3. McPherson & Pincus. Henry`s Clinical Diagnosis and Management by Laboratory Methods. 22nd Edition. 2011.

Brochure Rev: 05(1398/11/07)

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