



Набор ИФА для определения ЛЮТЕИНИЗИРУЮЩЕГО ГОРМОНА (ЛГ)

Кат. № : 4225Z
Количество тестов : 96
Производитель : DAI (США)

Методика от 10-10-2009

Внимание: основой при проведении анализа является оригинал инструкции на англ. языке.

Анализ	LH ELISA
Метод	Иммунсорбентный анализ с применением фиксированных ферментов
Принцип	Конъюгированный пероксидазой сэндвич-ИФА
Диапазон обнаружения	0-200 мМЕ/мл
Образец	50 мкл сыворотки
Специфичность	96 %
Чувствительность	2.0 мМЕ/мл
Общее время	~ 80 мин.
Срок годности	12-14 мес.

НАЗНАЧЕНИЕ

Набор предназначен для количественного определения лютеинизирующего гормона (ЛГ) в сыворотке человека.

ВВЕДЕНИЕ

Лютеинизирующий гормон (ЛГ) продуцируется у мужчин и женщин передней долей гипофиза в ответ на действие ЛГ-рилизинг гормона, который вырабатывается в гипоталамусе. ЛГ также вырабатывается интерстициальным стимулирующим клетки гормоном (ICSH) у мужчин - гликопротеин, молекулярным весом приблизительно 30 000 Д. Он состоит из двух нековалентно связанных ассоциированных различных аминокислотных цепей, альфа и бета. Альфа-цепь похожа с такой у тиреотропного гормона (ТТГ), фолликулостимулирующего (ФСГ) и человеческого хорионического гонадотропина (ХГТ). Вся разница между ними состоит из различных комбинаций аминокислот бета-цепи, которая и отвечает за иммунологическую дифференциацию.

Базальная секреция ЛГ у человека эпизодична и первичная его функция состоит в стимулировании интерстициальных клеток (клеток Лейдига), вырабатывающих тестостерон. Различие концентраций ЛГ в сыворотке связано у здоровых женщин с нормальными менструальными циклом и зависит от взаимодействий системы гонады-гипофиз-гипоталамус. Уменьшение прогестерона и эстрадиола после овуляции запускает менструальный цикл. При их уменьшении гипоталамус увеличивает продукцию гонадотропного релизинг-факторов (ГРФ), которые в свою очередь стимулируют гипофиз с увеличением продукции и секреции ФСГ. Увеличение ФСГ активирует несколько фолликулов в течение фолликулярной фазы, один из них станет зрелой яйцеклеткой. Когда фолликул развивается начинает секретироваться эстрадиол, вначале медленно, потом, к 12 или 13 дню нормального цикла, - все более увеличиваясь. ЛГ освобождается в связи с этой быстрой секрецией эстрадиола, который прямо стимулирует гипофиз с увеличением уровня ГРФ и ФСГ. Эти изменения лежат в основе преовуляторной фазы.

В промежутке 12-18 часов после достижения ЛГ наивысшего уровня происходит овуляция. После освобождения яйцеклетки, образуется желтое тело, которое секретировать прогестерон и эстроген - два гормона, взаимодействующие с ЛГ по механизму обратной связи. После овуляции наступает сразу постовуляторная фаза с высокими уровнями прогестерона, вторым пиком эстрадиола и низкими уровнями ЛГ и ФСГ. Низкий уровень ЛГ и ФСГ объясняется влияниями по механизму обратной связи на систему гипоталамус-гипофиз эстрадиола и прогестерона.

После оплодотворения растущий плод вырабатывает ХГТ, который продолжает активировать желтое тело для выработки прогестерона и эстрадиола. Если беременность не наступила, желтое тело регрессирует и наблюдается соответствующее уменьшение уровней прогестерона и эстрадиола, что проявляется менструацией. Из-за низкого их уровня гипоталаму вновь инициирует менструальный цикл.

У пациентов с гипогонадизмом наблюдается увеличенная концентрация ЛГ. Уменьшение продукции стероидных гормонов у женщин связан с незрелостью яичников, первичной их недостаточностью, поликистозом яичников или менопаузой; в этих случаях уровень ЛГ не регулируется. Похожее расстройство регуляции встречается у мужчин при недоразвитии или отсутствии яичек. Высокие концентрации ЛГ также встречаются при первичной недостаточности яичек и синдроме Кляйнфельтера, хотя при сохранении выработки андрогенов уровень ЛГ не обязательно увеличивается. Увеличение ЛГ также сопутствует почечной недостаточности, циррозу, гипертиреозидизму и истощению.

Недостаточная секреция передней доли гипофиза может вызывать низкие уровни ЛГ. Низкие уровни могут стать причиной бесплодия у мужчин и женщин. Низкие уровни ЛГ могут быть также связаны с уменьшением секреции ГРФ гипоталамусом, хотя этот же эффект может наблюдаться при недостаточном ответе передней доли гипофиза на стимуляцию ГРФ. Низкие уровни ЛГ могут также указывать на некоторые дисфункции гипофиза или гипоталамуса, но действительная причина должна быть подтверждена другими тестами.

При диагностике гипоталамической, гипофизарной или гонадальной дисфункции должно проводиться определение ЛГ вместе с ФСГ. Уровни гормонов используются для определения менопаузы, овуляции и мониторинга эндокринной терапии.

ПРИНЦИП АНАЛИЗА

Набор DAI LH EIA есть твердофазовый энзимно-связанный иммунсорбентный набор (ELISA). В анализе используется анти-LH антитело для иммобилизации твердой фазы (микротитрационные ячейки) и мышинное моноклональное анти-LH антитело в растворе антитело-энзим (пероксидаза хрена) конъюгата. Тестовый образец одновременно реагирует с антителами, в результате молекулы LH будут в «сэндвиче» между твердой фазой и энзимно-связанными антителами. После 60 минутной инкубации при комнатной температуре, ячейки промываются водой для удаления несвязанных маркированных антител. Добавляется раствор ТМВ и инкубируется на 20 минут, в результате происходит развитие голубого окраса. Развитие цвета останавливается добавлением стоп раствора, цвет изменяется на желтый и измеряется спектрофотометрически при 450 нм. Концентрация LH прямо пропорциональна интенсивности цвета в образце.

НЕОБХОДИМЫЕ МАТЕРИАЛЫ И ОБОРУДОВАНИЕ

Материалы, входящие в состав набора:

- Планшет с лунками, покрытыми антителами, 96 лунок.
- Набор стандартов, содержащих 0, 5, 20, 50, 100 и 200 мМЕ/мл (ВОЗ, 1-й IRP, 68/40), ЛГ человека, лиофилизированных.
- Ферментный конъюгат, 12 мл.
- ТМВ субстрат, 12 мл.
- Стоп-раствор (2N HCl), 12 мл.
- Промывочный буфер (50x), 15 мл.

Материалы, не входящие в состав поставки:

- Точные пипетки: 50; 100; 200 мкл и 1,0 мл.
- Наконечники для пипеток.
- Дистиллированная вода.
- Вихревой смеситель или аналог.
- Промокательная бумага или бумажное полотенце.
- Бумага для построения графиков.
- Микротитровальный планшет-ридер.

СБОР И ПОДГОТОВКА ОБРАЗЦОВ

Сыворотку получают из проб цельной крови, взятых подходящим способом. Набор предназначен для работы с образцами сыворотки без добавок.

ХРАНЕНИЕ НАБОРА И ИНСТРУМЕНТАРИЯ

Как невскрытый, так и вскрытый набор следует хранить при 2-8°C, а планшет - в закрытой упаковке с влагопоглотителем до конца срока годности. Для измерения абсорбции используется микропланшетный ридер при ширине полосы 10 нм или меньше и оптической плотностью 0-2 ОП или выше при длине волны 450 нм.

ПОДГОТОВКА РЕАГЕНТОВ

1. Перед использованием доведите реагенты до комнатной температуры (18-22°C).
2. Разведите каждый лиофилизированный стандарт 0.5 мл дистиллированной воды и оставьте перерастворенный материал по крайней мере на 20 минут. Перерастворенные стандарты должны храниться в закрытых флаконах при 2-8°C.
3. Разведите 1 часть промывочного буфера (50x) в дистиллированной воде, чтобы приготовить 750 мл

промывочного буфера (1х). Перед использованием хорошо перемешайте.

ЛИТЕРАТУРА

(См. в оригинале инструкции).

ПРОЦЕДУРА АНАЛИЗА

1. Поместите нужное количество лунок с антителами в рамку для стрипов. Создайте лист данных с идентификацией образца.
2. Внесите 50 мкл стандарта, образцов и контролей в соответствующие лунки.
3. Внесите 100 мкл ферментного конъюгата в каждую лунку.
4. Тщательно перемешивайте содержимое лунок в течении 30 секунд. Важно на этом этапе добиться полного перемешивания.
5. Инкубируйте пробы при комнатной температуре (18-22°C) в течение 60 мин.
6. Удалите инкубационную смесь, перевернув содержимое планшета над раковиной..
7. Промыть лунки промывочным буфером (1х) 5 раз.
8. Резко стукнуть лунками о промокательную бумагу или бумажные полотенца для удаления всех остатков жидкости.
9. Внесите 100 мкл раствора ТМБ в каждую лунку. Аккуратно перемешайте в течении 5 секунд.
10. Инкубируйте при комнатной температуре в течении 20 мин.
11. Остановите реакцию внесением 100 мкл стоп-раствора в каждую лунку.
12. Аккуратно перемешивайте на протяжении 30 сек. до смены окраски раствора на желтую.
13. Используя ридер для планшетов, измерьте оптическую плотность лунок при 450 нм на протяжении 30 мин.

Внимание:

Процедура промывки имеет большое значение. При недостаточно тщательном промывании результаты будут неточными, и уровень поглощения будет завышен.

РАСЧЁТ РЕЗУЛЬТАТОВ

Рассчитать средние значения поглощения (A_{450}) для каждого стандарта, контрольных сывороток и образцов. На бумаге для графиков построить калибровочную кривую, откладывая на вертикальной оси (Y) значение поглощения для каждого стандарта против его концентрации в мМЕ/мл на горизонтальной оси (X). С помощью средних значений поглощения для каждого образца по калибровочной кривой определить соответствующую концентрацию ЛГ в мМЕ/мл.

ПРИМЕР КАЛИБРОВОЧНОЙ КРИВОЙ

Результаты типичного использования стандартов со считыванием ОП при 450 нм указаны на оси Y против концентраций ЛГ на оси X. Настоящая калибровочная кривая приведена в качестве иллюстрации и не должна использоваться для расчета неизвестных значений. Каждый пользователь должен получить свои собственные данные и калибровочную кривую.

ЛГ (мМЕ/мл)	Поглощение (450 нм)
0	0.000
5	0.169
20	0.552
50	1.150
100	2.079
200	3.027

(Пример построения калибровочной кривой см. в оригинале инструкции на стр. 4).

ОЖИДАЕМЫЕ ЗНАЧЕНИЯ И ЧУВСТВИТЕЛЬНОСТЬ

Для каждой лаборатории рекомендуется установить свои собственные значения уровней ЛГ, соответствующие нормальным, на основании результатов анализа статистически достоверного количества клинически охарактеризованных образцов крови. Приведенные ниже значения уровней ЛГ считать приблизительными:

Взрослый мужчина	0-25 мМЕ/мл
Женщина фолликулярная фаза	0-40 мМЕ/мл
Середина цикла	40-150 мМЕ/мл
Лютеальная фаза	0-30 мМЕ/мл
Пост менопауза	20-200 мМЕ/мл
Перед половой зрелостью, женщина	0-9 мМЕ/мл
Перед половой зрелостью, мужчина	0-17 мМЕ/мл

Минимальная концентрация ЛГ, определяемая с помощью этого набора, составляет 2 мМЕ/мл.

ИНФОРМАЦИЯ ДЛЯ ЗАКАЗА:

ЧМП «ДИАМЕБ»
Ул. Чорновола, 97, г. Ивано-Франковск, 76005
Тел.: (0342) 775122
Тел/факс: (0342) 775612
E-mail: info@diameb.ua
www.diameb.ua