

НАБОР ИФА
ДЛЯ КОЛИЧЕСТВЕННОГО ОПРЕДЕЛЕНИЯ
КОНЦЕНТРАЦИИ
ФОЛЛИКУЛОСТИМУЛИРУЮЩЕГО
ГОРМОНА В СЫВОРОТКЕ ЧЕЛОВЕКА

4224-16, FSH

Каталог. № : 4224-16

Методика от 09-25-2013

Количество : 96

Производитель: DAI (США)



Основой при проведении анализа является оригинал инструкции на английском языке, вложенной в набор. Номер и дата версии оригинала и перевода инструкции должны совпадать.

Анализ	FSH ELISA
Метод	Иммунсорбентный анализ с применением фиксированных ферментов
Принцип	Конъюгированный пероксидазой ИФА
Диапазон обнаружения	0-200 мМЕд/мл
Образец	50 мкл сыворотки
Специфичность	95 %
Чувствительность	2.0 мМЕд/мл
Общее время	~ 80 мин.
Срок годности	12-14 мес.

НАЗНАЧЕНИЕ

Предназначен для количественного определения концентрации фолликулостимулирующего гормона (ФСГ) в сыворотке человека.

ВВЕДЕНИЕ

Фолликулостимулирующий (ФСГ) и лютеинизирующий гормоны (ЛГ) принимают участие в регуляции роста и репродуктивной деятельности гонадальных тканей, которые синтезируют и выделяют мужские и женские половые гормоны.

ФСГ это гликопротеин, который выделяется базофильными клетками гипофиза. Гонадотропный рилизинг-гормон (ГРГ), который вырабатывается в гипоталамусе, контролирует освобождение ФСГ в гипофизе. Как и другие гликопротеины ЛГ, ТСГ и ХГЧ, ФСГ состоят из субъединиц альфа и бета. Гормоны этого типа имеют очень похожую структуру, поэтому биологические и иммунологические свойства каждого зависят от единственных в своем роде бета-субъединиц.

У женщин ФСГ стимулирует рост и созревание фолликулов, действуя прямо на рецепторы зернистых клеток; увеличивается под его действием фолликулярный стероидогенез и стимулируется выработка ЛГ. Выработанный ЛГ потом связывается клетками теки и стимулирует стероидогенез. При созревании фолликула происходит увеличение внутри овариальной продукции эстрадиола, таким образом стимулируя активность рецепторов ФСГ и его связывание. Так что ФСГ, ЛГ и эстрадиол задействованы в укреплении яичников и дозревании у женщин.

Уровень ФСГ растет после менопаузы, кастрации и преждевременной недостаточности яичников. Уровень ФСГ может быть нормализован назначением эстрогенов, что указывает на существование механизма обратной связи. Ненормальные взаимодействия между ФСГ и ЛГ, ФСГ и эстрогеном могут быть связаны с нервной анорексией и поликистозной болезнью яичников. Тем не менее, существуют исключения, когда при яичниковой недостаточности определяется концентрация ФСГ более 40 мМЕ/мл. Рост семенных канальцев и поддержание сперматогенеза также регулируются ФСГ. Хотя и андрогены в отличие от эстрогенов не уменьшают уровень ФСГ, тем не менее, выявляется обратная связь только с сывороточным ЛГ. С не совсем понятных причин, у мужчин с олигоспермией и азоспермией определяются увеличенные уровни ФСГ. Опухоль яичек в целом угнетают концентрацию ФСГ в плазме. Высокий уровень ФСГ в мужчин может определяться при первичной тестикулярной недостаточности и синдроме Кляйнфельтера. Увеличение его также происходит иногда при голодании, почечной недостаточности, гипертиреозидизме и циррозе.

ПРИНЦИП АНАЛИЗА

Настоящий набор является твердофазовым ферментосвязанным иммунсорбентным набором (ELISA). В анализе используется поликлональное анти-ФСГ антитело для иммобилизации твердой

фазы (микротитрационные лунки) и мышинное моноклональное анти-ФСГ антитело в растворе антитело-фермент (пероксидаза хрена) конъюгата. Исследуемый образец одновременно реагирует с антителами, в результате молекулы ФСГ будут в «сэндвиче» между твердой фазой и ферментно-связанными антителами. После 60 минутной инкубации при комнатной температуре, лунки промываются водой для удаления несвязанных маркированных антител. Добавляется раствор ТМВ и инкубируется на 20 минут, в результате происходит развитие голубого окраса. Развитие цвета восстанавливается добавлением стоп раствора, цвет изменяется на желтый и измеряется спектрофотометрически при 450 нм. Концентрация ФСГ прямо пропорциональна интенсивности цвета в образце.

МАТЕРИАЛЫ И КОМПОНЕНТЫ

Материалы, входящие в состав набора:

1. Планшет с лунками, покрытыми антителами, 96 лунок.
2. Набор референтных стандартов, содержащих 0, 5, 20, 50, 100 и 200 мМЕд/мл (ВОЗ, 2-й IRP, HMG), ФСГ человека, жидкие, готовые к использованию, 1.0 мл.
3. Ферментный конъюгат, 12 мл.
4. ТМВ субстрат, 12 мл.
5. Стоп-раствор (2N HCl), 12 мл.
6. Концентрат промывочного буфера (50x), 15 мл.

Требуемые, но не поставляемые материалы:

1. Точные пипетки: 0.05- 0.2 мл и 1.0 мл.
2. Сменные наконечники для пипеток.
3. Дистиллированная вода.
4. Вихревой смеситель или аналог.
5. Промокательная бумага или бумажное полотенце.
6. Бумага для построения графиков.
7. Микротитрационный 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

Как не вскрытый, так и вскрытый набор следует хранить при 2-8°C, а планшет – в закрытой упаковке с влагопоглотителем до конца срока годности. Вскрытый набор остается стабилен до окончания срока пригодности при хранении согласно инструкции. Подходящим является микропланшетный ридер с шириной размаха 10 нм или меньше и оптической плотностью 0-2 ОП или выше при длине волны 450 нм.

ПОДГОТОВКА РЕАГЕНТОВ

1. Перед использованием приведите все реагенты к комнатной температуры (18-22°C).
2. Разведите 1 часть промывочного буфера (50x) 49 частями дистиллированной воды. Например, разведите 15 мл промывочного буфера (50x) дистиллированной водой, чтобы приготовить 750 мл промывочного буфера (1x). Перед использованием хорошо перемешайте.

ПРОЦЕДУРА АНАЛИЗА

1. Поместите нужное количество лунок с антителами в рамку для стрипов.
2. Внесите **50 мкл** стандартов, образцов и контролей в соответствующие лунки.
3. Внесите **100 мкл** ферментного конъюгата в каждую лунку.
4. Тщательно перемешайте содержимое лунок в течении 30 секунд. Важно добиться полного перемешивания.
5. Инкубируйте пробы при комнатной температуре (18-25°C) в течении **60 мин.** Приготовьте раствор ТМБ во время этой инкубации.
6. Удалите инкубационную смесь, удалив содержимое планшет в емкость для отходов.
7. Промойте лунки промывочным буфером и вытряхнуть содержимое 5 раз.
8. Перевернуть планшет и резко постучать им по растленному листу промокательной бумаги или бумажного полотенца для удаления остатков жидкости.
9. Внесите **100 мкл** раствора ТМБ в каждую лунку. Аккуратно перемешайте в течении 5 секунд.
10. Инкубируйте при комнатной температуре в темном месте 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.

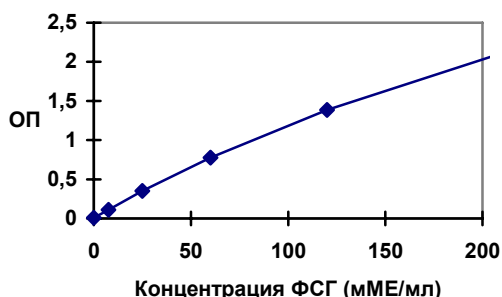
РАСЧЁТ РЕЗУЛЬТАТОВ

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 мМЕд/мл на горизонтальной оси (X). С помощью средних значений поглощения для каждого образца по калибровочной кривой определить соответствующую концентрацию ФСГ в мМЕ/мл.

Пример построения калибровочной кривой

Результаты получают с помощью калибровочной кривой. Пример построения калибровочной кривой приведен в качестве иллюстрации. Ее нельзя использовать для расчета концентраций ФСГ в пробах.

ФСГ (мМЕд/мл)	Поглощение (450 нм)
0	0,007
5.0	0,095
20.0	0,286
50.0	0,669
100.0	1,307
200.0	2,584

**ОЖИДАЕМЫЕ ЗНАЧЕНИЯ И ЧУВСТВИТЕЛЬНОСТЬ**

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

Женская фолликулярная фаза	0-20 мМЕд/мл
Середина цикла	15-30 мМЕд/мл
Лютеальная фаза	0-20 мМЕд/мл
После менопаузы	40-200 мМЕд/мл
Мужчина	0-20 мМЕд/мл

Минимальная концентрация ФСГ, определяемая с помощью этого набора, составляет 2,5 мМЕд/мл.

РАБОЧИЕ ХАРАКТЕРИСТИКИ

I. Достоверность: сравнение между нашим тестом и коммерчески доступным тестом предоставило следующие данные:

N = 124
 Коэффициент корреляции = 0.980
 Наклон = 1.01
 Пересечение = 0.34
 Среднее (наши наборы) = 28.8
 Среднее (Bio-Rad) = 26.0

II. Точность:**1) Внутрисерийная:**

Концентрации	N	Среднее	SD	CV, %
Уровень 1	20	9.17	0.54	5.93
Уровень 2	20	21.04	1.24	5.90
Уровень 3	20	50.62	2.16	4.27

2) Между сериями:

Концентрации	N	Среднее	SD	CV, %
Уровень 1	20	8.71	0.65	7.50
Уровень 2	20	20.09	1.82	9.04
Уровень 3	20	55.42	4.29	7.75

III. Линейность:

Две сыворотки пациента с серийно разводили Стандартом 0 мМЕд/мл в линейном исследовании. Среднее восстановление составило 101.0 %.

Образец А			
Разведение	Ожидаемое значение	Полученное значение	Восстановление, %
Неразбавленный	112.54	112.54	
2X	56.27	56.29	100.0
4X	28.14	28.58	101.6
8X	14.07	15.08	107.2
16X	7.03	7.45	105.9

Образец В			
Разведение	Ожидаемое значение	Полученное значение	Восстановление, %
Неразбавленный	98.78	98.78	
2X	49.39	49.41	100.0
4X	24.69	23.31	94.4
8X	12.35	12.03	97.4
16X	6.17	6.23	101.0

Среднее восстановление: 98.2 %

IV. Восстановление

Различные образцы сыворотки с известным уровнем FSH смешивались и анализировались в дубликатах. Среднее восстановление составило 98.7 %.

Ожидаемое значение	Полученное значение	Восстановление, %
5.03	5.09	101.1
17.41	17.47	100.3
29.76	28.55	95.9
34.15	33.05	96.8
39.78	41.82	105.1
52.83	49.25	93.2

Среднее восстановление: 98.7 %

V. Чувствительность

Минимальная определяемая концентрация этого анализа составляет 2.0 мМЕд/мл.

VI. Перекрестная реактивность

Следующие антигены маркеров рака в высоких концентрациях были проанализированы, чтобы определить возможные реактивности.

Antigens	Concentration	Equivalent FSH
hCG	100,000 mIU/ml	0.0 mIU/ml
TSH	100 µIU/ml	0.0 mIU/ml
LH	500 mIU/ml	0.0 mIU/ml
Prolactin	200 ng/ml	0.0 mIU/ml
HGH	200 ng/ml	0.0 mIU/ml

VII. Хук-эффект

Хук-эффект не наблюдался при концентрациях 3.000 мМЕд/мл FSH.



ОФИЦИАЛЬНЫЙ ДИСТРИБЬЮТОР

ООО «ДИАМЕБ»
 ул. Чорновола, 97
 г. Ивано-Франковск, 76005
 тел.: +38 (0342) 775 122
 факс: +38 (0342) 775 123
 e-mail: info@diameb.ua
www.diameb.com