



Набор для определения СЕКС-ГОРМОНА СВЯЗЫВАЮЩЕГО ГЛОБУЛИНА

Кат. № : 104-E-SHB-1P
Количество : 96
Производитель: Dima Diagnostika

Методика от 08/2007

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

ИСПОЛЬЗОВАНИЕ

Данный иммуноферментный анализ предназначен для количественного определения глобулина, связывающего половой гормон (SHBG) в сыворотке человека

КЛИНИЧЕСКОЕ ОБЪЯСНЕНИЕ

Глобулин, связывающий половой гормон (SHBG) является бета-глобулином, который специфически связывает стероидные гормоны. Молекулярный вес составляет 86 кДа/моль. Основная его часть синтезируется в гепатоцитах. Его выработка регулируется равновесием андрогенов/эстрогенов, тиреоидными гормонами, инсулином, среди которых и пищевые факторы. SHBG принимает участие в передвижении половых гормонов в плазме. Его концентрация выступает основным фактором, регулирующим распределение гормонов между протеин связанными и гормонами в свободном состоянии. Определение концентрации SHBG имеет в значительной мере значение при оценке незначительных расстройств метаболизма андрогена, что позволяет определить гирсутизм у женщин, которые могут быть чувствительны к терапии эстрогена. Соотношение тестостерон/SHBG хорошо измеряется и определяется на свободный тестостерон, и помогает различать между пациентами с чрезмерной активностью андрогена и нормальными индивидами.

ПРИНЦИП АНАЛИЗА

Моноклональное антитело, специфичное для SHBG иммобилизуется на микролунках планшета, и другое моноклональное антитело, также специфичное для SHBG, конъюгируется с пероксидазой хрена (HRP). SHBG из образца связан с планшетами. После второго промывочного этапа вносится ферментный субстрат. Ферментная реакция пропорциональна количеству SHBG в образце. Реакция останавливается добавлением стоп раствора. Абсорбция измеряется на планшеточном ридере (фотометре).

МАТЕРИАЛЫ

Необходимые, но не поставляемые

1. Пипетки со сменными пластиковыми наконечниками; 25 мкл (стандарты, образцы).
2. Многоканальная пипетка со сменными пластиковыми наконечниками.
3. Крышка или запечатывающая лента для микролуночного планшета.
4. Кюветка для реагента.
5. Прибор для аспирации.
6. Фотометр (планшетный или стрип ридер) на 450 нм.

ПРЕДОСТЕРЕЖЕНИЯ

SHBG ELISA анализ предназначен только для использования в диагностике *in vitro*. Реагент содержит консервант тимеросал. Контрольная сыворотка приготовлена из человеческой сыворотки, которая негативна к HbsAg, ВИЧ антителам и антителу гепатита С. Однако такие анализы не в состоянии доказать полное отсутствие

вирусов, поэтому с контрольной сывороткой нужно обращаться с соответствующими мерами предосторожности.

РАЗБАВЛЕНИЕ ОБРАЗЦОВ

Образцы сыворотки с концентрациями SHBG больше самых высоких стандартов далее нужно разбавлять Буфером анализа. Исправьте результат, используя соответствующий фактор разбавления.

СОДЕРЖИМОЕ НАБОРА

Реактивов хватает на 96 лунок. Набор нужно хранить при 2-8°C. Неоткрытый набор стабилен до окончания срока годности, указанной на этикетке набора. Срок годности неоткрытого компонента набора указан на этикетке компонента.

1. **Раздельные лунки, 96 лунок** на планшете, покрытом мышинным моноклональным SHBG антителом, запечатанном в многослойный пластиковый пакет. Готовы к использованию.
2. **Буфер анализа, 50 мл.** Готов к использованию.
3. **SHBG стандарты.** Готовы к использованию. Стандарты А-Е 0,5 мл. Калиброванные относительно человеческого SHBG. Значения стандартов составляют 0, 4, 16, 65, и 260 нмоль/л. Точные значения стандартов указаны на этикетке каждого флакона.
4. **Контроль.** Готов к использованию. 0.5 мл.
5. **Ферментный конъюгат,** 12 мл, готов к использованию. Мышиное моноклональное SHBG антитело, конъюгированное с пероксидазой хрена. Разбавить требуемый объем в Буфере анализа перед использованием.
6. **Промывочный раствор,** 25 мл. (40х конц.). Разбавить в 975 мл дистиллированной воды.
7. **Раствор ТМВ субстрата,** 12 мл. ТМВ. Готов к использованию.
8. **Стоп раствор,** 12 мл. 0,25 М. H₂SO₄. Избегайте контакта с глазами и кожей.

ПРОВЕДЕНИЕ АНАЛИЗА

1. Перед использованием приведите все реагенты к комнатной температуре. Разбавьте промывочный концентрат.
2. Пометьте используемые на планшете лунки.
3. Разбавьте стандарты, контрольную сыворотку и образцы **1+20** буфером анализа.
4. Внесите **100 мкл** буфера анализа в каждую лунку.
5. Внесите **25 мкл** разбавленных стандартов, контроля и образцов сыворотки в соответствующие лунки и встряхните планшет в течении 5 сек.
6. Накройте планшет и **инкубируйте 30 мин.** при комнатной температуре.
7. Удалите содержимое микропланшета аспирацией и промойте лунки **3 раза 300 мкл** промывочного раствора.
8. Внесите в лунки **100 мкл** ферментного конъюгата.
9. Накройте планшет и **инкубируйте 15 мин.** при комнатной температуре.
10. Промойте лунки как указано выше (**3 x 300 мкл**).
11. Через соответствующие интервалы времени добавьте **100 мкл** раствора ТМВ субстрата в каждую лунку.
12. Накройте планшет и **инкубируйте 12 мин.** при комнатной температуре (20-25°C); **инкубируйте 8 мин.** при температуре (26°C и более).
13. Чтобы остановить реакцию добавьте **100 мкл** стоп раствора в каждую лунку через те же интервалы что и этапе 11. Встряхните легко планшет чтобы перемешать растворы
14. Считайте абсорбцию в каждой лунке при 450 нм, используя планшетный или стрип ридер по крайней мере в течении 5 минут. После остановки субстратной реакции.

ПРИМЕЧАНИЯ ПО МЕТОДИКЕ

1. Защищайте планшеты от сквозняка, сильного света или прямого солнечного света в течение процедуры анализа.
2. Осторожная аспирация промывочного раствора важна для достижения высокой точности анализа.
3. Поскольку распределение времени этапов инкубации важно для проведения анализа, вносите образцы и конъюгат без остановки. Пипетирование образцов не должно превышать 10 минут, чтобы избежать сбоя анализа. При использовании более одного планшета в процессе анализа, рекомендуется включать стандартную кривую для каждого планшета.
4. Добавление Раствора ТМВ субстрата ведет к кинетической реакции, которая прекращается после распределения стоп раствора. Придерживайтесь времени инкубации для каждой лунки, добавляя реагенты через одинаковые промежутки времени.
5. Защищенные от света, значения абсорбции стабильны в течение 60 минут.
6. Планшетные ридеры измеряют абсорбцию вертикально. Не касайтесь дна лунок.

ПРОЦЕДУРА АНАЛИЗА - ИТОГ

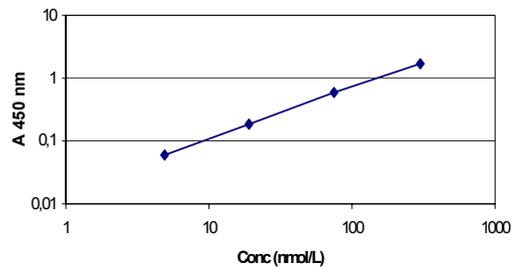
	Стандарты 0 – 260 нмоль/л (1:20)	Контрольная сыворотка (1:20)	Образцы (1:20)
Пометьте полоски			
Внесите буфер анализа (мкл)	100	100	100
Внесите разбавленные стандарты, Контрольная сыворотка и образцы (мкл)	25	25	25
Инкубировать 30 минут при комнатной температуре			
Промыть 3 раза			
Внести ферментный конъюгат (мкл)	100	100	100
Инкубировать 15 минут при комнатной температуре			
Промыть 3 раза			
Внесите раствор ТМВ субстрата (мкл)	100	100	100
Инкубировать 15 минут при комнатной температуре			
Стоп раствор (мкл)	100	100	100
Перемешать			
Измерить абсорбцию при 450 нм			

РЕЗУЛЬТАТЫ

1. Вычислите среднюю абсорбцию для каждого дубликата.
2. Отнимите значение абсорбции нулевого стандарта от значений средней абсорбции стандартов, контроля и образцов.
3. Нарисуйте стандартную кривую на графопостроительной бумаге, выводя значения абсорбции стандартов против соответствующих концентраций SHBG.
4. Считайте концентрации SHBG для контроля и образцов. Рабочий лист и стандартная кривая типичного анализа прилагаются ниже: не для использования при вычислении фактических результатов анализа.

Лунки	Идентификация	A 450 нм		Концентрация нмоль/л
1-2	Ст. 0 нмоль/л	0.041		
3-4	Ст. 4	0.096	0.055	
5-6	Ст. 20	0.236	0.195	
7-8	Ст. 7	0.621	0.580	
	Ст. 300	1.731	1.690	
11-12				
13-14	Образец 1	0.203	0.162	16
15-16	Образец 2 (контроль)	0.461	0.420	54
	Образец 3	1.153	1.102	190

SHBG



КОНТРОЛЬ КАЧЕСТВА

Рекомендуется использование внутренних контролей в каждом.

Результаты контролей должны быть в пределах установленных норм.

ОЖИДАЕМЫЕ ЗНАЧЕНИЯ

Были анализированы образцы сыворотки здоровых женщин и мужчин, используя SHBG ELISA набор, и получены следующие результаты:

	Кол-во образцов	SHBG нмоль/л Среднее Норма	
М	102	43	15-100
Ж	44	62	15-120

Каждая лаборатория должна определить свой собственный контрольный диапазон.

РАБОЧИЕ ХАРАКТЕРИСТИКИ

1. **Граничное определение.** На основании результатов 16 определений нулевого стандарта, минимальная концентрация SHBG, обнаруженная методом, составляет 0.2 нмоль/л. Граничное определение обозначает значение, равное 2 CO (стандартное отклонение) от нулевого стандарта.

2. **Точность.** Точность внутри и между анализами установлена исходя из анализа трех сывороток пациентов с различными концентрациями SHBG. Результаты показаны в Таблицах 1 и 2.

Таблица 1. Точность внутри анализа

Пациенты	Число репликантов	Среднее нмоль/л	СО нмоль/л	КВ %
1	16	4.5	0.39	8.6
2	16	16	0.68	4.3
3	16	57	1.7	3.0
4	16	158	8.4	5.3

Таблица 2. Точность между анализами

Пациенты	Число репликантов	Среднее нмоль/л	СО нмоль/л	КВ %
1	16	3.8	0.44	11.6
2	16	19	1.6	8.4
3	16	63	5.5	8.7
4	16	194	14	7.2

3. **Восстановление.** Известное количество SHBG было добавлено к трем сывороткам пациентов и были измерены восстановленные величины. Результаты показаны в Таблице 3.

Таблица 3. Восстановление

Образец	Эндogenous SHBG нмоль/л	Добавленный SHBG нмоль/л	Ожидаемый SHBG нмоль/л	Полученный SHBG нмоль/л	Восстановление %
1	39	6.5	45.5	42	92
1	39	28.5	67.5	67	99
1	39	165	204	208	102
2	61	6.5	67.5	63	93
2	61	28.5	89.5	91	102
2	61	165	226	224	99
3	157	6.5	163.5	170	104
3	157	28.5	185.5	210	113
3	157	165	322	307	95

4. **Линейность** (разбавление анализа).

Четыре образца пациентов были разбавлены буфером анализа 1:2, 1:5 и 1:10. Значения SHBG были анализированы и результаты исправлены при использовании факторов разбавления. Результаты восстановления этих разбавлений показаны в Таблице 4.

Таблица 4. Разбавление образцов

Образец	Неразбавленный SHBG, нмоль/л	Восстановление %		
		1:2	1:5	1:10
1	58	100	107	97
2	85	100	117	108
3	120	102	100	102
4	185	89	95	96

5. **Специфичность.** Специфичность анализа SHBG ELISA изучена измерение ответной реакции SHBG, вызванной высокими уровнями TBG (тироксин Связывающего глобулина) и CBG (кортизол, связывающего глобулина), Никаких перекрестных реакций не было обнаружено, анализируя до 500 мг/л TBG и 500 мг/л CBG.

6. Эффект крюка с высокой дозой. Анализ был проверен на эффект крюка с концентрацией SHBG до 10000 нмоль/л. Эффекта крюка не наблюдалось.

Информация для заказа:

ЧМП «ДИАМЕБ»
 Ул. Чорновола, 97,
 г. Ивано-Франковск, 76005
 Тел.: +38 (0342) 77 51 22
 Тел/факс: +38 (0342) 77 56 12
 E-mail: info@diameb.com