

Human Luteinizing Hormone (LH) ELISA Kit

مقدمه :

هورمون Luteinizing (LH) ملکولی گلیکوپروتئینی بزرگی است که دارای دو زیرواحد آلفا و بتا می باشد. زیرواحد آلفا در سه هورمون TSH, LH و FSH مترشح از هیپوفیز قدامی یکسان هستند، در حالیکه زیرواحد بتا در آنها متفاوت بوده و این زیرواحد توانایی اتصال به رسپتور مربوطه را داراست. این هورمون از هیپوفیز قدامی از سلول هایی تحت عنوان گنادوتروف ها ترشح می شوند. در هر دو جنس زن و مرد، LH ترشح استروئیدهای جنسی از غدد جنسی را تحریک می کند. در بیضه ها، اتصال LH به رسپتورهای روی سلولهای لیدیگ (Leydig cells) باعث تحریک سنتز و ترشح تستوسترون می شود. در تخمدان ها، LH باعث تحریک ترشح استروژن می شود. در زنان، تخمک گذاری فولیکول های بالغ در تخمدان با ترشح ناگهانی و بالای LH القاء می شود که تحت عنوان موج LH قبل از تخمک گذاری (preovulatory LH surge) نامیده می شود. سلول های باقی مانده داخل فولیکول های تخمک گذاری شده برای تشکیل اجسام زرد رشد می کنند. این اجسام زرد هورمون های استروئیدی پروژسترون و استرادیول ترشح می کنند که پروژسترون برای نگهداری بارداری ضروری است. در اغلب پستانداران، LH برای ادامه بقاء و عملکرد اجسام زرد مورد نیاز است. در واقع نام LH از این اثر تولید جسم زرد (luteinization) از فولیکول های تخمدان منشاء گرفته شده است. تعیین غلظت این هورمون در مسئله باروری حائز اهمیت می باشد.

اساس روش اندازه گیری :

کیت الایزا LH موجود، براساس سنجش ایمنولوژیکی آنزیمی ساندویچی تهیه شده است. LH موجود در نمونه ها بعنوان آنتی ژن به دو آنتی بادی زوج اختصاصی خود متصل می گردد. هر دو آنتی بادی از نوع منوکلونال موشی هستند که یکی بر روی فاز جامد (چاهک ها) پوشش داده شده است و دیگری به آنزیم HRP متصل شده است. نمونه مورد آزمایش که دارای LH است، در معرض دو آنتی بادی قرار می گیرد. پس از زمان انکوباسیون، چاهک ها تخلیه شده و شستشو داده می شوند تا آنتی بادی متصل به آنزیم HRP اضافی خارج گردد. سپس به هرچاهک سوبسترای آنزیم اضافه می شود که فعالیت آنزیم بطور مستقیم با غلظت LH در نمونه ها متناسب است. استانداردهای LH با غلظت مشخص، همراه با نمونه های مجهول آزمایش می شوند که براساس منحنی استاندارد جذب نور در مقابل غلظت LH، غلظت نمونه های مجهول بدست می آید.

معرف ها :

- ۱- میکروپلیت پوشش داده شده: شامل ۹۶ چاهک جداسدنی که با آنتی بادی منوکلونال موشی ضد LH پوشش داده شده اند.
- ۲- کونژوگه آنزیمی (HRP-Anti-LH) : یک ویال ۱۲ میلی لیتری آماده مصرف.
- ۳- استانداردها: ۶ ویال یک میلی لیتری از استاندارد با غلظت های ۵، ۱۰، ۲۵، ۵۰ و ۱۰۰ mIU/ml که در سرم نرمال انسانی تهیه شده و از تیمورسال بعنوان نگهدارنده استفاده شده است.
- ۴- سرم کنترل: یک ویال یک میلی لیتری آماده مصرف.
- ۵- محلول شستشو دهنده غلیظ (20X) : یک ویال ۲۵ میلی لیتری محلول شستشو که برای تهیه محلول شستشوی آماده مصرف لازم است این محلول به نسبت ۱/۲۰ با آب دیونیزه رقیق شود.
- ۶- محلول رنگ ز: یک ویال ۱۲ میلی لیتری محلول آماده مصرف

۷- محلول متوقف کننده واکنش: یک ویال ۱۲ میلی لیتری اسیدسولفوریک یک نرمال.

مواد و وسایل مورد نیاز که در کیت موجود نیست :

- ۱- سمپلرهای ۵۰ و ۱۰۰ میکرولیتری دقیق
- ۲- آب دیونیزه
- ۳- دستگاه الایزا ریدر دارای فیلتر ۴۵۰ نانومتری و در صورت امکان ۶۳۰ نانومتری بعنوان فیلتر رفرانس.
- ۴- کاغذ جاذب رطوبت
- ۵- انکوباتور ۳۷ درجه

نکات قابل توجه برای مصرف کنندگان :

- ۱- در این کیت از سرم انسانی استفاده شده است که از نظر HbsAg و HIV منفی بوده اند.
- ۲- از تماس محلول متوقف کننده واکنش (1N H₂SO₄) خودداری کنید. در صورت تماس، با آب فراوان آنرا بشوئید.
- ۳- از استفاده از مواد پس از تاریخ انقضاء خودداری کنید و از مخلوط کردن یا استفاده از کیت ها با شماره بچ مختلف پرهیز نمائید.
- ۴- درب ظروف را پس از استفاده ببندید و از تعویض درب ها جدا خودداری کنید.
- ۵- محلول های محتوی مواد افزودنی یا نگهدارنده مثل سدیم آزیاید نباید در واکنش آنزیمی وارد شوند.

تهیه و جمع آوری نمونه :

- ۱- آزمایش را باید بر روی نمونه های سرمی انجام داد. نمونه های شدیداً همولیزه و دارای چربی باید حذف شوند.
- ۲- نمونه ها را می توان برای هفت روز در دمای ۲ تا ۸ درجه سانتیگراد و برای زمان های طولانی تر (تا سی روز) در دمای ۲۰- درجه سانتیگراد نگهداری نمود.
- ۳- از انجماد و ذوب مکرر نمونه ها باید خودداری کرد.

آماده سازی معرف ها :

- ۱- کلیه معرف ها را به دمای اتاق برسانید. قبل از استفاده آنها را به آرامی تکان دهید.
- ۲- برای تهیه محلول شستشوی آماده مصرف، یک حجم از بافر شستشو غلیظ (20X) را با ۱۹ حجم آب دیونیزه رقیق نمائید.

روش انجام آزمایش :

- ۱- تعداد چاهک های کوت شده برای استانداردها، کنترل و نمونه های بیمار را بصورت ۲ تایی انتخاب کنید و مابقی چاهک ها را همراه ماده آنگیر درون کیسه مخصوص قرار داده و درب آنرا ببندید.
- ۲- ۵۰ میکرولیتر از استانداردها، کنترل و نمونه های بیمار را به داخل هر چاهک بریزید.
- ۳- ۱۰۰ میکرولیتر از کونژوگه آنزیمی (HRP-Anti-LH) را به تمام چاهک ها اضافه کنید.
- ۴- پلیت را بمدت ۶۰ - ۳۰ ثانیه به آرامی تکان دهید تا محتویات چاهک ها خوب مخلوط شوند. سپس درب چاهک ها را با برچسب مخصوص پلیت پوشانده و چاهک ها را بمدت سی دقیقه در درجه حرارت ۳۷ درجه سانتیگراد و تاریکی انکوبه کنید.
- ۵- محتویات چاهک ها را خالی کرده و چاهک ها را ۵ بار با ۳۰۰ میکرولیتر بافر شستشوی آماده مصرف بشوئید. برای شستشوی چاهک ها، ابتدا ۳۰۰ میکرولیتر بافر شستشو را داخل چاهک بریزید، سپس چاهک ها را وارونه کرده و همراه با تکان دادن خالی کنید و در انتهای شستشو، با ضربات ملایم بر روی کاغذ جاذب تمامی مایع موجود در چاهک ها را تخلیه نمائید.

خصوصیات کیت

۱- حساسیت

با تکرار و خوانش جذب استاندارد صفر، حساسیت کیت برای تعیین مقدار LH، بر اساس محاسبه $0.0 + 3SD$ برابر 1 mIU/ml بدست آمد.

۲- دقت

برای محاسبه میزان دقت در یک روز و روزهای مختلف، آزمایش بر روی ۳ نمونه سرم ۲۰ بار تکرار شد که ضریب تغییرات به شرح ذیل است.

ضریب تغییرات در روز

نمونه سرم	دفعات تکرار	میانگین (mIU/ml)	انحراف معیار	ضریب تغییرات (CV)
1	20	3.1	0.26	8.2
2	20	43.0	2.8	6.5
3	20	72.0	3.7	5.1

ضریب تغییرات در روزهای مختلف

نمونه سرم	دفعات تکرار	میانگین (mIU/ml)	انحراف معیار	ضریب تغییرات (CV)
1	10	5.6	0.33	5.9
2	10	22.8	1.0	4.6
3	10	53.8	3.1	5.8

۳- ویژگی

آنتی بادی های منوکلونال مورد استفاده در این کیت الایزا اختصاصی LH انسانی می باشند. هیچگونه تداخلی با TSH، FSH و HCG انسانی در غلظت های طبیعی دیده نشده است.

۴- خطی بودن

سه نمونه مختلف سرمی با استاندارد صفر به نسبت های ۱:۲، ۱:۴ و ۱:۸ رقیق شدند. سپس غلظت LH در آنها با استفاده از کیت محاسبه شد که نتایج ذیل بدست آمد.

نمونه سرمی	غلظت اولیه (mIU/ml)	درصد بازیابی		
		1:2	1:4	1:8
1	55.6	104	108	110
2	70.2	105	106	105
3	120.6	98	105	103

۶- ۱۰۰ میکرولیتر از سوبسترای آماده مصرف به تمامی چاهک ها اضافه کنید و آنها را بمدت ۱۵ دقیقه در دمای اتاق و تاریکی انکوبه نمایید.

۷- ۱۰۰ میکرولیتر از محلول متوقف کننده واکنش به همه چاهک ها اضافه کنید. سپس جذب نور هر چاهک را در طول موج ۴۵۰ نانومتر با دستگاه الایزا ریدر قرائت نمایید (در صورت امکان از طول ۶۳۰ نانومتر بعنوان فیلتر رفرانس استفاده کنید). سنجش جذب نوری باید حداکثر تا ۳۰ دقیقه پس از اتمام آزمایش انجام شود.

محاسبه نتایج

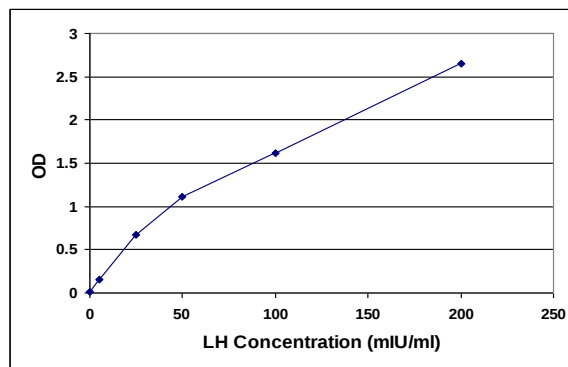
۱- با استفاده از میانگین جذب نوری استانداردها (محور Y) و غلظت مشخص آنها (محور X) برروی کاغذ میلی متری، منحنی استاندارد رسم کنید.

۲- میانگین جذب نوری برای هر نمونه را بدست آورده و روی محور Y جای آنرا پیدا کنید. سپس نقطه مذکور را توسط خطی به منحنی وصل کنید. از نقطه بدست آمده خطی عمود بر محور X وارد کنید تا نقطه تلاقی که نشان دهنده غلظت نمونه است، بدست آید.

راهنمای محاسبه

مقادیر جذب نوری ارائه شده در جدول ذیل تنها بعنوان راهنمایی آورده شده است و هر آزمایشگاهی باید برای هر بار آزمایش یک منحنی استاندارد جدید بدست آورد.

ردیف	مقدار استاندارد (mIU/ml)	جذب
1	0	0.011
2	5	0.154
3	10	0.674
4	25	1.112
5	50	1.612
6	100	2.647



مقادیر طبیعی

بدلیل اختلافات سنی، نژادی و رژیم تغذیه، نمی توان برای تمام جمعیت ها محدوده مرجع تعیین کرد. بنابراین هر آزمایشگاه باید محدوده مرجع خود را گزارش نماید. در نمونه هایی که در Boarder line قرار دارند، آزمایش مجدد حتما تکرار شود. مقادیر طبیعی در سرم افراد نرمال که توسط آزمایشات مکرر به روش الایزا بدست آمده است به قرار زیر می باشد:

زنان	
0.5 – 10.5 mIU/ml	فاز فولیکولی
18.4 – 61.2 mIU/ml	میانه دوره ماهیانه
0.5 – 10.5 mIU/ml	فاز لوتئال
8.2 – 50.5 mIU/ml	دوران یائسگی
مردان	
0.7 – 7.4 mIU/ml	مقدار طبیعی