# کیت الایزا برای تعیین غلظت 25-هیدروکسی ویتامین دی-3 در سرم انسانی

**25-Hydroxyvitamin-D3 ELISA Kit in Human Serum**

**مقدمه**

ویتامین D نوعی سکواستروئید می باشد. این ویتامین دارای دو شکل شیمیایی مجزا (ویتامین D2 و D3) می باشد که از نظر بیولوژیکی دارای اثرات یکسان می باشند. ویتامین D2 یک ملکول 28 کربنی است که از ارگوسترول گیاهی مشتق می شود. در حالیکه ویتامین D3 یک ملکول 27 کربنی است و از کلسترول مشتق می گردد. شکل فعال بیولوژیکی ویتامین D در گردش خون، مشتق 25 هیدروکسیله آن می باشد. وقتی ویتامین D وارد بدن انسان می شود، در کبد هیدروکسیله شده و به شکل فعال آن تبدیل می شود. مشتق 25 هیدروکسیله ویتامین D، شکل عمده ذخیره ویتامین D در بدن می باشد. لذا تعیین غلظت 25-OH-Vitamin D3 در سرم، نشانگر اولیه سطح این ویتامین در بدن می باشد.

**اساس روش اندازه گیری**

کیت الایزای 25-Hydroxyvitamin D3 موجود بر اساس سنجش ایمونولوژیکی رقابتی تهیه شده است. در این کیت از روش پوشش آنتی بادی استفاده شده است. 25-OH-Vitamin D3 موجود در نمونه ها برای اتصال به آنتی بادی منوکلونال ضد 25-OH-Vitamin D3 که برروی پلیت پوشش داده شده است، با 25-OH-Vitamin D3-Biotin رقابت می کند. پس از زمان انکوباسیون، پلیت ها تخلیه می شوند. سپس کونژوگه HRP-Streptavidin به چاهک ها اضافه می شود. پس از زمان انکوباسیون، چاهک ها تخلیه شده و شستشو داده می شوند. سپس به هر چاهک سوبسترای آنزیم اضافه می شود که فعالیت آنزیم بطور معکوس با غلظت 25-OH-Vitamin D3 در نمونه ها متناسب است. استانداردهای 25-OH-Vitamin D3 با غلظت مشخص، همراه با نمونه های مجهول آزمایش می شوند که بر اساس منحنی استاندارد جذب نور در مقابل غلظت 25-OH-Vitamin D3، غلظت نمونه های مجهول بدست می آید.

**معرف ها**

1- پلیت های پوشش داده شده: شامل 96 چاهک جداشدنی که با آنتی بادی ضد 25-OH-Vitamin D3 تهیه شده در گوسفند پوشش داده شده اند.

2- استانداردها : 6 ویال نیم میلی لیتری از استاندارد با غلظت های 0، 4، 10، 60,25 و 120 براساس ng/ml که در سرم نرمال انسانی تهیه شده و از تیومرسال بعنوان نگهدارنده استفاده شده است.

3- بافر استخراج : یک ویال 25 میلی لیتری.

4- کونژوگه بیوتینه غلیظ (Biotin- 25-OH-Vitamin D3) (50X) : یک ویال نیم میلی لیتری که برای تهیه بافر استخراج آماده مصرف لازم است این محلول به نسبت 1/50 با بافر استخراج رقیق شود.

5- سرم کنترل: دو ویال نیم میلی لیتری آماده مصرف.

6- کونژوگه آنزیمی (HRP-Streptavidine) : دو ویال 12 میلی لیتری آماده مصرف.

7- محلول شستشو دهنده غلیظ (20X) : یک ویال 50 میلی لیتری محلول شستشو که برای تهیه محلول شستشوی آماده مصرف لازم است این محلول به نسبت 1/20 با آب دیونیزه رقیق شود.

8- محلول رنگ زا: دو ویال 12 میلی لیتری محلول آماده مصرف

9- محلول متوقف کننده واکنش: یک ویال 12 میلی لیتری اسیدسولفوریک یک نرمال.

**مواد و وسایل مورد نیاز که در کیت موجود نیست**

1- سمپلر 25، 100 و 200 میکرولیتری دقیق

2- آب دیونیزه

3- انکوباتور 1 ± 37 درجه سانتیگراد

4- کاغذ جاذب رطوبت

**نکات قابل توجه برای مصرف کنندگان**

1- در این کیت از سرم انسانی استفاده شده است که از نظر HbsAg و HIV منفی بوده اند.

2- از تماس محلول متوقف کننده واکنش ($1N\ H_2SO_4$) با پوست خودداری کنید. در صورت تماس، با آب فراوان آنرا بشوئید.

3- از استفاده معرفات کیت پس از تاریخ انقضاء خودداری کنید و از مخلوط کردن یا استفاده از کیت ها با شماره بچ مختلف پرهیز نمائید.

4- درب ظروف را پس از استفاده ببندید و از تعویض درب ها جدا خودداری کنید.

5- محلول های محتوی مواد افزودنی یا نگهدارنده مثل سدیم آزاید نباید در واکنش آنزیمی وارد شوند.

6- کیت های باز نشده پس از تحویل باید در دمای 8-2 درجه سانتی گراد (یخچال) نگه داری شوند. میکروپلیت باید در کیسه در بسته به همراه ماده جاذب رطوبت نگه داری شود. کیت باید تا تاریخ انقضا استفاده شود (یکسال از زمان تولید). برای اطلاع از تاریخ انقضا به برچسب کیت مراجعه شود.

7- کیت های باز شده حداکثر به مدت 2 ماه پایدار خواهد ماند، اگر در شرایط توصیه شده در بالا نگهداری شود.

8- توصیه می شود که بیشتر از 32 چاهک در هر مرحله کاری استفاده نشود. اگر پی پت به صورت دستی انجام می گیرد، پی پت کردن همه استانداردها، نمونه ها ، کنترل ها باید در 5 دقیقه تمام شود. برای پی پت کردن کل پلیت 96 تستی باید از پی پت اتوماتیک استفاده شود.

9- فرآیند شستشو خیلی مهم است. شستشوی ناکافی باعث کاهش دقت و افزایش کاذب جذب می شود.

**تهیه و جمع آوری نمونه**

1- آزمایش را باید بر روی نمونه های سرمی انجام داد. نمونه های شدیدا همولیزه و دارای چربی باید حذف شوند.

2- نمونه ها را می توان برای دو روز در دمای 2 تا 8 درجه سانتیگراد و برای زمان های طولانی تر (تا سی روز) در دمای 20- درجه سانتیگراد نگهداری نمود.

3- از انجماد و ذوب مکرر نمونه ها باید خودداری کرد.

**آماده سازی معرف ها**

1- کلیه معرف ها را به دمای اتاق برسانید. قبل از استفاده آنها را به آرامی تکان دهید (سر و ته نمائید).
2- برای تهیه بافر استخراج آماده مصرف، در یک ظرف شیشه ای تمیز، یک حجم از کونژوگه بیوتینه غلیظ (50X) را با 49 حجم بافر استخراج رقیق نمائید. برای هر بار آزمایش این محلول باید تازه تهیه شود. این محلول بلافاصله پس از تهیه همراه به دو دقیقه شیک، بایستی مصرف شود.

| ردیف | تعداد استریپ مورد استفاده | حجم بافر استخراج (زرد رنگ) (mL) | حجم کونژوگه بیوتینه (قرمز رنگ) (µL) |
|---|---|---|---|
| 1 | دو | 4 | 80 |
| 2 | چهار | 8 | 160 |
| 3 | شش | 12 | 240 |
| 4 | هشت | 14 | 280 |
| 5 | ده | 18 | 360 |
| 6 | دوازده | 22 | 440 |

3- برای تهیه محلول شستشوی آماده مصرف، یک حجم از بافر شستشو غلیظ (20X) را با 19 حجم آب دیونیزه رقیق نمائید.

**روش انجام آزمایش**

1- تعداد چاهک های کوت شده برای استانداردها، کنترل ها و نمونه های بیمار را انتخاب کنید.
2- 25 میکرولیتر از استانداردها، سرم کنترل و نمونه های بیمار را به داخل هر چاهک بریزید.
3- 200 میکرولیتر از بافر استخراج آماده مصرف را به تمام چاهک ها اضافه کنید.
4- پلیت را حداقل بمدت یک دقیقه به آرامی تکان دهید تا محتویات چاهک ها خوب مخلوط شوند. سپس درب چاهک ها را با برچسب مخصوص پلیت پوشانده، آنرا بمدت یک ساعت در درجه حرارت 37 درجه سانتیگراد و تاریکی انکوبه کنید.
5- محتویات چاهک ها را خالی کرده و چاهک ها را 3 بار با 300 میکرولیتر بافر شستشوی آماده مصرف بشوئید. برای شستشوی چاهک ها، ابتدا 300 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.
6- 200 میکرولیتر از کونژوگه آنزیمی آماده مصرف به تمامی چاهک ها اضافه کنید. سپس درب چاهک ها را با برچسب مخصوص پلیت پوشانده و چاهک ها را بمدت سی دقیقه در درجه حرارت 37 درجه سانتیگراد و تاریکی انکوبه کنید.
7- محتویات چاهک ها را خالی کرده و چاهک ها را 5 بار با 300 میکرولیتر بافر شستشوی آماده مصرف بشوئید. برای شستشوی چاهک ها، ابتدا 300 میکرولیتر بافر شستشو را داخل چاهک بریزید، سپس چاهک ها را وارونه کرده و همراه با تکان د ادن خالی کنید و در انتهای شستشو، با ضربات ملایم بر روی کاغذ جاذب تمامی مایع موجود در چاهک ها را تخلیه نمائید.
8- 200 میکرولیتر از سوبسترای آماده مصرف به تمامی چاهک ها اضافه کنید و آنها را بمدت 15 دقیقه در دمای اتاق و تاریکی انکوبه نمائید.
9- 100 میکرولیتر از محلول متوقف کننده واکنش به همه چاهک ها اضافه کنید و بمدت 15 ثانیه کاملا مخلوط شود . خیلی مهم است تا مطمئن شوید رنگ آبی کاملاً به رنگ زرد تغییر پیدا کرده است.
10- جذب نور هر چاهک را در طول موج 450 نانومتر با دستگاه الایزا ریدر قرائت نمائید (در صورت امکان از طول 630 نانومتر بعنوان فیلتر رفرانس استفاده کنید). سنجش جذب نوری باید حداکثر تا 15 دقیقه پس از اتمام آزمایش انجام شود.

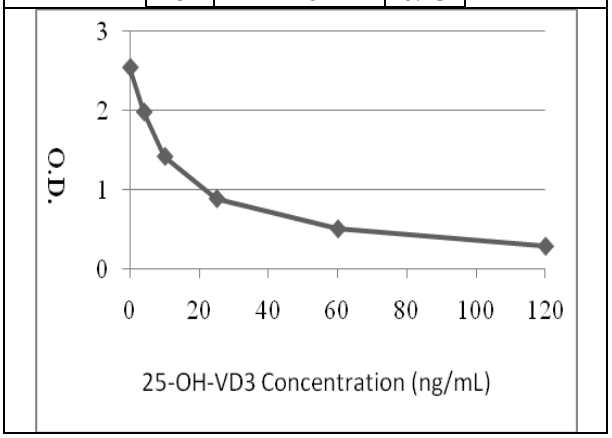
**محاسبه نتایج**

1- با استفاده از میانگین جذب نوری استانداردها (محور Y) و غلظت مشخص آنها (محور X) برروی کاغذ میلی متری، منحنی استانداردی رسم کنید.
2- 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.
3- با استفاده از کامپیوتر این محاسبات ساده خواهد شد.

**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.

| No. | Standard Con. (ng/mL) | O.D. |
|---|---|---|
| 1 | 0 | 2.54 |
| 2 | 4 | 1.98 |
| 3 | 10 | 1.42 |
| 4 | 25 | 0.89 |
| 5 | 60 | 0.51 |
| 6 | 120 | 0.29 |




**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. مقادیر طبیعی در سرم افراد نرمال که توسط آزمایشات مکرر با این روش بدست آمده است به قرار زیر می باشد:

| غلظت ویتامین D3 (ng/ml) | سطح دریافت |
|---|---|
| کمتر از 10 | کمبود |
| 10 - 30 | ناکافی |
| 30 - 70 | کافی |



PGI شرکت پادتن گستر ایثار (استان مرکزی- شهرک صنعتی مامونیه- خیابان هفتم پلاک 5، تلفن 086-45253368)

| | |
|---|---|
| 100-70 | بیش از حد نرمال |
| بیشتر از 100 | سمی |

برای تبدیل به واحد به شرح ذیل می توان عمل کرد:

$$ng/ml \times 2.5 = nmol/L$$

**خصوصیات کیت**

1- حساسیت

با رقیق سازی متوالی استاندارد 4 با سرم صفر، حساسیت این کیت برای تعیین مقدار هورمون 25-OH-VitaminD3 برابر 1 ng/ml بدست آمد.

2- دقت

برای محاسبه میزان دقت در یک روز و روزهای مختلف، آزمایش بر روی 3 نمونه سرم 20 بار تکرار شد که ضریب تغییرات به شرح ذیل است.

ضریب تغییرات در روز

| نمونه سرم | دفعات تکرار | میانگین (ng/ml) | انحراف معیار | ضریب تغییرات (%CV) |
|---|---|---|---|---|
| 1 | 20 | 4.5 | 0.34 | 7.5 |
| 2 | 20 | 35.4 | 1.88 | 5.3 |
| 3 | 20 | 88.4 | 3.62 | 4.1 |

ضریب تغییرات در روزهای مختلف

| نمونه سرم | دفعات تکرار | میانگین (ng/ml) | انحراف معیار | ضریب تغییرات (%CV) |
|---|---|---|---|---|
| 1 | 10 | 6.4 | 0.52 | 8.1 |
| 2 | 10 | 42.1 | 3.00 | 7.1 |
| 3 | 10 | 75.2 | 4.59 | 6.1 |

3- ویژگی

از مواد زیر برای بررسی میزان تداخل این کیت استفاده شد.

| نوع ماده | درصد تداخل |
|---|---|
| 25-OH-VitaminD3 | 100 |
| 25-OH-Vitamin D2 | 100 |
| Vitamin D3 | < 0.04 |
| Vitamin D2 | < 0.05 |



PGI شرکت پادتن گستر ایثار (استان مرکزی- شهرک صنعتی مامونیه- خیابان هفتم پلاک 5، تلفن 086-45253368)