25 OH Vitamin D

کیت الایزا جهت تعیین غلظت 25–هیدروکسی ویتامین دی در سرم انسانی

25-Hydroxyvitamin-D ELISA Kit in Human Serum

NAMIRA GENE

مقدمه

ویتامین D نوعی سکواستروئید با دو شکل شیمیایی مجزا (D2 و D3) می باشد که از نظر بیولوژیکی دارای اثرات یکسان هستند. ویتامین D2 یک ملکول **۲۸** کربنی است که از ارگوسترول گیاهی مشتق می شود. در حالی که ویتامین D3 یک ملکول **۲۷** کربنی است و از کلسترول مشتق می گردد. شکل فعال بیولوژیکی ویتامین D در گردش خون، مشتق **۲۵** 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 **۲۵** هیدروکسیله ویتامین D، شکل عمده ذخیره ویتامین D در بدن می باشد. لذا تعیین غلظت 25-OH-Vitamin D در سرم، نشانگر اولیه سطح این ویتامین در بدن می باشد.

اساس روش اندازه گیری

کیت الایزای 25-OH-Vitamin D موجود بر اساس سنجش ایمونولوژیکی رقابتی تهیه شده است. در این کیت از روش پوشش آنتی بادی استفاده شده می شود.
25-OH-Vitamin D موجود در نمونه ها برای اتصال به آنتی بادی منوکلونال ضد 25-OH-Vitamin D که برروی پلیت پوشش داده شده است ،
با 25-OH-Vitamin D-Biotin رقابت می کند. پس از زمان انکوباسیون، پلیت‌ها 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 D در نمونه ها متناسب است.
استاندارد های 25-OH-Vitamin D با غلظت مشخص، همراه با نمونه های مجهول آزمایش می شوند که بر اساس منحنی استاندارد جذب نور در مقابل غلظت 25-OH-Vitamin D ، غلظت نمونه های مجهول به دست می آید.

معرف ها

۱- پلیت های پوشش داده شده: شامل **۹۶** چاهک جداشدنی که با آنتی بادی ضد 25-OH-Vitamin D تهیه شده از گوسفند پوشش داده شده اند.
۲- استانداردها **۶** ویال نیم میلی لیتری از استاندارد با غلظت های صفر ، **۱۰، ۲۰، ۴۰، ۸۰، ۱۲۰** براساس ng/ml که در سرم نرمال انسانی تهیه شده و از تیومرسال به عنوان نگهدارنده استفاده شده است.
۳- بافر استخراج : یک ویال **۲۴** میلی لیتری.
۴- کونژوگه بیوتینه غلیظ (21X) (Biotin- 25-OH-Vitamin D) : یک ویال **۱,۵** میلی‌لیتری که برای تهیه بافر استخراج آماده مصرف لازم است این محلول به نسبت **۱/۲۱** با بافر استخراج رقیق شود. (به cc ۱ بافر استخراج **۵۰** لاندا بیوتین اضافه گردد)
۵- سرم کنترل: دو ویال **۰,۵** میلی لیتری آماده مصرف.
۶- کونژوگه آنزیمی (HRP-Streptavidine) : یک ویال **۱۲** میلی لیتری آماده مصرف.
۷- محلول شستشو دهنده غلیظ (25X) : یک ویال **۴۰** میلی لیتری محلول شستشو که برای تهیه محلول شستشوی آماده مصرف لازم است این محلول به نسبت **۱/۲۵** با آب دیونیزه رقیق شود.
۸- محلول رنگ زا: یک ویال **۱۲** میلی لیتری محلول آماده مصرف
۹- محلول متوقف کننده واکنش: یک ویال **۱۲** میلی لیتری

مواد و وسایل مورد نیاز که در کیت موجود نیست

۱- سمپلر **۲۰** ، **۱۰۰**و **۲۰۰** میکرولیتری دقیق
۲- آب دیونیزه
۳- کاغذ جاذب رطوبت

نکات قابل توجه برای مصرف کنندگان

۱- از تماس محلول متوقف کننده واکنش (HCL 1N) با پوست خودداری کنید. در صورت تماس، با آب فراوان آن را بشوئید.
۲- از استفاده معرف ها کیت پس از تاریخ انقضاء خودداری کنید و از مخلوط کردن یا استفاده از کیت ها با شماره بچ مختلف پرهیز نمائید.
۳- درب ظروف را پس از استفاده ببندید و از تعویض درب ها جدا خودداری کنید.
۴- محلول های محتوی مواد افزودنی یا نگهدارنده مثل سدیم آزاید نباید در واکنش آنزیمی وارد شوند.
۵- کیت های باز نشده پس از تحویل باید در دمای **۲- ۸** 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 انقضاء استفاده شود. برای اطلاع از تاریخ انقضاء به برچسب کیت مراجعه شود.

جمع آوری و پایداری نمونه

۱- آزمایش را بر روی نمونه های **سرمی** انجام داده و از به کار بردن نمونه های همولیز و لیپمیک خود داری فرمایید.
۲- نمونه ها به مدت دو روز در دمای **۲- ۸** درجه سانتی گراد و به مدت یک ماه در درمای **۲۰-** درجه سانتی گراد قابل نگهداری می باشند.
۳- از انجماد و ذوب مکرر نمونه ها جدا خودداری فرمایید.

آماده سازی معرف ها

۱- **با توجه به اینکه جداسازی ویتامین–دی از پروتئین های سرم برای تعیین مقدار از اهمیت ویژه ای برخوردار است و این موضوع به دما وابسته است حداقل دو ساعت قبل شروع آزمایش، کیت را در دما اتاق قرار دهید. تا کاملا به دمای محیط برسد. (یا بافر استخراج را قبل از انجام تست به مدت ۱۵ دقیقه در ۳۷ درجه قرار دهید.)**
۲- قبل از استفاده کلیه معرف های کیت را به آرامی تکان دهید (سر و ته نمائید).
۳- برای تهیه بافر استخراج آماده مصرف، در یک ظرف شیشه ای تمیز، **۱** حجم از کونژوگه بیوتینه غلیظ (21X) را با **۲۰** حجم بافر استخراج (**به ۱cc بافر استخراج ۵۰ لاندا بیوتین اضافه گردد)** رقیق نموده و کاملا مخلوط نمایید. برای هر بار آزمایش این محلول باید تازه تهیه شود.

ردیف	تعداد استریپ مورد استفاده	حجم بافر استخراج (mL)	حجم کونژوگه بیوتینه (µL)
1	دو	4	200
2	چهار	8	400
3	شش	12	600
4	هشت	14	700
5	ده	18	900
6	دوازده	22	1100

۴- برای تهیه محلول شستشو آماده مصرف، **۱** حجم از **بافر شستشو غلیظ (25X)** را با **۲۴** حجم آب دیونیزه رقیق نمائید.

روش انجام تست در دمای اتاق

۱- تعداد چاهک های کوت شده برای استانداردها، کنترل ها و نمونه های بیمار را انتخاب کنید.

۲- **۲۰** میکرولیتر از استانداردها، کنترل و نمونه های بیمار را به داخل هر چاهک بریزید.

۳- **۲۰۰** میکرولیتر از بافر استخراج آماده مصرف شده (طبق روش آماده سازی معرف ها) را به تمام چاهک ها اضافه کنید.

۴- **پلیت را حداقل بمدت یک دقیقه به آرامی تکان دهید تا محتویات چاهک ها به خوبی مخلوط شوند.** سپس درب چاهک ها را با برچسب مخصوص پلیت پوشانده، آن را بمدت **۶۰** دقیقه در دمای اتاق(۲۵-۲۳) انکوبه کنید

۵- محتویات چاهک ها را خالی کرده و چاهک ها را **۵** مرتبه 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.

۶- **۱۰۰** 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 به مدت **۲۰** دقیقه در دمای اتاق(۲۵-۲۳) انکوبه کنید.

۷- محتویات چاهک ها را خالی کرده و چاهک ها را **۵** مرتبه با 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 د ادن خالی کنید و در انتهای شستشو، با ضربات ملایم بر روی کاغذ جاذب تمامی مایع موجود در چاهک ها را تخلیه نمائید.

۸- **۱۰۰** میکرولیتر از سوبسترای آماده مصرف به تمامی چاهک ها اضافه کنید و آنها را به مدت **۱۵** دقیقه در دمای اتاق(۲۵-۲۳) انکوبه نمائید.

۹- **۱۰۰** میکرولیتر از محلول متوقف کننده واکنش به همه چاهک ها اضافه کنید و بمدت **۱۵** ثانیه کاملا مخلوط شود . خیلی مهم است تا مطمئن شوید رنگ آبی کاملاً به رنگ زرد تغییر پیدا کرده است. ۱۰- جذب نور هر چاهک را در طول موج **۴۵۰** نانومتر با دستگاه الایزا ریدر قرائت نمائید (در صورت امکان از طول **۶۳۰** نانومتر بعنوان فیلتر رفرانس استفاده کنید). سنجش جذب نوری باید حداکثر تا **۱۵** دقیقه پس از اتمام آزمایش انجام شود.

توجه!(روش انجام تست در دمای ۳۷درجه سانتیگراد)

جهت انجام تست در درجه حرارت ۳۷ درجه سانتیگراد تمامی مراحل مشابه روش انجام تست در دمای محیط می باشد با این تفاوت که تمامی انکوباسیون های کیت به جای دمای اتاق در درجه حرارت ۳۷ درجه سانتیگراد انجام می شود. و همچنین بعد از اضافه نمودن سرم ها و بافر استخراج در مرحله اول انکوباسیون **به جای ۶۰ دقیقه، ۴۵ دقیقه** انکوبه نمایید.

محاسبه نتایج

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

۳- با استفاده از کامپیوتر این محاسبات ساده انجام خواهد شد.

راهنمای محاسبه

مقادیر جذب نوری ارائه شده در جدول ذیل تنها به عنوان 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**	**2.62**
2	**10**	**2.13**
3	**20**	**1.66**
4	**40**	**1.24**
5	**80**	**0.734**
6	**120**	**0.43**

مقادیر طبیعی

به دلیل 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 به دست آمده است به قرار زیر می باشد:

غلظت ویتامین D (ng/ml)	سطح دریافت
کمتر از 20	Defficient
21 – 30	Insufficient
31 – 70	Prefered Level
71-100	High level
بیشتر از 100	**Toxic**

برای تبدیل واحد به شرح ذیل می توان عمل کرد:

ng/ml × 2.5 = nmol/L

خصوصیات کیت

۱- **حساسیت** : با رقیق سازی متوالی استاندارد **۴** با سرم صفر، حساسیت این کیت برای تعیین مقدار هورمون 25-OH-VitaminD برابر ng/ml **۱** 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 (ng/ml)	ضریب تغییرات (%CV)
1	20	11	14.3
2	20	28	10.1
3	20	46	7.6

ضریب تغییرات در روزهای مختلف

نمونه سرم	دفعات تکرار	میانگین (ng/ml)	ضریب تغییرات (%CV)
1	20	12	15.2
2	20	30	11.1
3	20	51	8.7

۳- **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

منابع

1. Holick, MF. Vitamin D Status: Measurement, Interpretation and Clinical Application. Ann Epidemoil. 2009, 19(2):73 – 78
2. Morris H. A. Vitamin D: A Hormone for All Seasons-How Much is enough? Clin. Biochem. Rev., 2005, 26, 21-32.
3. Bikle D. D. Vitamin D and the skin. J. Bone Miner. Metab., 2010, 28, 117-30.
4. Zerwekh J. E. Blood biomarkers of vitamin D status. Am. J. Clin. Nutr., 2008, 87, 1087S-91S.
5. Moyad M. A. Vitamin D: a rapid review. Dermatol Nurs., 2009, 21, 25-30