شرکت بهشاد تجهیز اصفهان

ELISA KIT

دستورالعمل استفاده از

کیت الایزا برای تعیین غلظت ۲۵–هیدروکسی ویتامین دی در سرم انسانی بصورت کمی

25-Hydroxy vitamin-D ELISA Kit in Human Serum

۹۶ تستی

آدرس کارخانه : استان مرکزی کیلومتر ۸۰ اتوبان تهران–ساوه،
شهرک صنعتی مامونیه خیابان هفتم پلاک ۵

آدرس دفتر: اصفهان ، خیابان شمس آبادی ، کوچه کازرونی
مجتمع صدف ، طبقه دوم تلفن : ۲۳–۳۲۲۳۸۷۲۰ – ۰۳۱

فهرست مطالب

عنوان	صفحه
۱- مقدمه	2
۲- اساس روش اندازه گیری	3
۳- معرف ها	4
۴- مواد و وسایل مورد نیاز که در کیت موجود نیست	5
۵- نکات قابل توجه برای مصرف کنندگان	6
۶- تهیه و جمع آوری نمونه	7
۷- آماده سازی معرف ها	8
۸- روش انجام آزمایش	10
۹- محاسبه نتایج	13
۱۰- راهنمای محاسبه	14
۱۱- مقادیر طبیعی	15
۱۲- خصوصیات کیت	16

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

ضریب تغییرات در روز

نمونه سرم	دفعات تکرار	میانگین (ng/ml)	انحراف معیار	ضریب تغییرات (CV)
۱	20	4.5	0.34	7.5
۲	20	35.4	1.88	5.3
۳	20	88.4	3.62	4.1

ضریب تغییرات در روزهای مختلف

نمونه سرم	دفعات تکرار	میانگین (ng/ml)	انحراف معیار	ضریب تغییرات
۱	10	6.4	0.52	8.1
۲	10	42.1	3.00	7.1
۳	10	75.2	4.59	6.1

۱-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 ۲۸ کربنی است که از ارگوسترول گیاهی مشتق می شود. در حالیکه 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.

۲- اساس روش اندازه گیری

کیت الایزای25-Hydroxyvitamin D موجود بر اساس سنجش ایمونولوژیکی رقابتی تهیه شده است. در این کیت از روش پوشش آنتی بادی استفاده شده است. 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، 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 D در نمونه ها متناسب است. استانداردهای 25-OH-Vitamin D با غلظت مشخص، همراه با نمونه های مجهول آزمایش می شوند که بر اساس منحنی استاندارد جذب نور در مقابل غلظت25-OH-Vitamin D3، غلظت نمونه های مجهول بدست می آید.

۱۲- خصوصیات کیت

۱- حساسیت

با رقیق سازی متوالی استاندارد ۴ با سرم صفر، حساسیت این کیت برای تعیین مقدار هورمون 25-OH-VitaminD برابر ۱ ng/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.

۱۱- 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 D (ng/ml)	سطح دریافت
کمتر از ۱۰	کمبود
۱۰ - ۳۰	ناکافی
۳۰ - ۷۰	کافی
۷۰-۱۰۰	بیش از حد نرمال
بیشتر از ۱۰۰	سمی

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

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

۳- معرف ها

۱- پلیت های پوشش داده شده: شامل ۹۶ چاهک جداشدنی که با آنتی بادی ضد 25-OH-Vitamin Dتهیه شده در گوسفند پوشش داده شده اند.

۲- استانداردها : ۶ ویال ۰/۵ میلی لیتری از استاندارد با غلظت های ۰، ۱۰، ۲۵، ۵۰، ۷۵ و ۱۰۰ براساس ng/ml که در سرم نرمال انسانی تهیه شده و از تیومرسال بعنوان نگهدارنده استفاده شده است.

۳- بافر استخراج : یک ویال ۳۵ میلی لیتری.

۴- کونژوگه بیوتینه غلیظ (Biotin-25-OH-Vitamni D) (50X) : یک ویال ۰/۷۵ میلی لیتری که برای تهیه بافر استخراج آماده مصرف لازم است این محلول به نسبت یک به ۵۰ با بافر استخراج رقیق شود.

۵- سرم کنترل: دو ویال ۰/۵ میلی لیتری آماده مصرف.

۶- کونژوگـه آنزیمـی (HRP-Streptavidine) : یـک ویـال ۱۲ میلی لیتری آماده مصرف.

۷- محلول شستشو دهنده غلیظ (20X) : یـک ویـال ۲۵ میلـی لیتری محلول شستشو که برای تهیـه محلـول شستـشوی آمـاده مصرف لازم است این محلول به نسبت ۱/۲۰ با آب دیونیزه رقیـق شود.

۸- محلول رنگ زا: یک ویال ۱۲ میلی لیتری محلول آماده مصرف

۹- محلول متوقف کننده واکنـش: یـک ویـال ۱۲ میلـی لیـتری اسیدسولفوریک یک نرمال.

۴- مواد و وسایل مورد نیاز که در کیت موجود نیست

۱- سمپلر ۲۵ ۱۰۰ و ۲۰۰ میکرولیتری دقیق

۲- آب دیونیزه

۳- کاغذ جاذب رطوبت

۱۰- راهنمای محاسبه

مقادیر جذب نوری ارائه شده در جدول ذیل تنها بعنوان راهنمـایی آورده شده است و هر آزمایشگاهی باید بـرای هـر بـار آزمـایش یـک منحنـی استاندارد جدید بدست آورد.

No.	Vit D Con. (ng/ml)	OD
1	0	2.95
2	10	2.22
3	25	1.53
4	50	1.02
5	75	0.74
6	120	0.51

۹- محاسبه نتایج

۱- با استفاده از میانگین جـذب نـوری اسـتانداردها (محـور Y) و غلظت مشخص آنها (محور X) برروی کاغذ میلی مـتری، منحنـی استانداردی رسم کنید.

۲- میانگین جذب نوری برای هـر نمونـه را بدسـت 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 بـر محـور X وارد کنید تا نقطه تلاقی که نـشان دهنـده غلظـت نمونـه اسـت، بدست آید.

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

۵- نکات قابل توجه برای مصرف کنندگان

۱- در این کیت از سرم انسانی استفاده شده است که از نظر HBs.Ag و HIV منفی بوده اند . با این وجود با توجه به اینکه هیچ روش آزمایشی نمی تواند فقدان عوامل عفونی در نمونه را تضمین نماید ، لذا تا حد امکان احتیاطات لازم را هنگام کار با این کیت مراعات نمائید .

۲- از تماس محلول متوقف کننده واکنش ($۱N\ H_۲SO_۴$) با پوست خودداری کنید. در صورت تماس، با آب فراوان آنرا بشوئید.

۳- 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.

۴- 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 ۸-۲ درجه سانتی گراد (یخچال) نگه داری شوند. میکروپلیت باید در کیسه در بسته به همراه ماده جاذب رطوبت نگه داری شود.

۶- کیت باید تا تاریخ انقضا استفاده شود (یکسال از زمان تولید). برای اطلاع از تاریخ انقضا به برچسب کیت مراجعه شود.

۷- کیت های باز شده حداکثر به مدت ۲ ماه پایدار خواهد ماند، اگر در شرایط توصیه شده در بالا نگهداری شود.

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

۶- تهیه و جمع آوری نمونه

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

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.

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 بمدت ۳۰ دقیقه در درجه اتاق (۲۲ تا ۲۸ درجه سانتیگراد) و تاریکی انکوبه کنید.

۷- 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 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 بمدت ۱۵ دقیقه در دمای اتاق و تاریکی انکوبه

۲- نمونه ها را می توان برای دو 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 خوداری کرد.

۷- 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 ، لذا می بایستی کلیه معرف ها را قبل از استفاده به دمای اتاق برسانید . **بنابراین توصیه می شود حداقل یک ساعت قبل شروع آزمایش ، کیت را در حرارت اتاق قرار دهید .**

۲- قبل از استفاده کلیه معرف های کیت را به آرامی تکان دهید (سر و ته نمایید) .

۳- برای تهیه بافر استخراج آماده مصرف ، در یک ظرف شیشه ای تمیز ، یک حجم از کونژوگه بیوتینه غلیظ (50X) را با ۴۹ حجم بافر استخراج رقیق نموده و کاملا مخلوط نمایید . برای هر بار آزمایش این محلول باید تازه تهیه شود .

راهنمای رقیق سازی و تهیه بافر استخراج آماده مصرف

ردیف	تعداد استریپ مورد استفاده	حجم بافر استخراج (زرد رنگ) (mL)	حجم کونژوگه بیوتینه (قرمز رنگ) (µL)
۱	دو	۴	۸۰
۲	چهار	۸	۱۶۰
۳	شش	۱۲	۲۴۰
۴	هشت	۱۴	۲۸۰
۵	ده	۱۸	۳۶۰
۶	دوازده	۲۲	۴۴۰

۴- برای تهیه محلول شستشوی آماده مصرف ، یک حجم از بافر شستشو غلیظ (20X) را با ۱۹ حجم آب دیونیزه رقیق نمایید .

۸- روش انجام آزمایش

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

۲– ۲۵ میکرولیتر از استانداردها، سرم کنترل و نمونه های بیمار را به داخل هر چاهک بریزید.

۳- ۲۰۰ میکرولیتر از بافر استخراج آماده مصرف شده (طبق دستور العمل شماره ۳ 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 خوب مخلوط شوند (در این مرحله مخلوط کردن کامل بسیار مهم است). سپس درب چاهک ها را با برچسب مخصوص پوشانده و پلیت را بمدت یک ساعت در درجه حرارت اتاق (۲۲ تا ۲۸ 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.