Code No. VDK0101-96

کیت الایزای تعیین غلظت 25-OH Vitamin D در سرم انسانی
25-Hydroxy Vitamin-D ELISA Kit (96 tests)

اساس آزمایش

این کیت برای اندازه گیری کمی مقدار ویتامین D سرم یا پلاسمای انسان ساخته شده است.

ویتامین D یک ویتامین نامحلول در آب است که عمدتا توسط پروتئین متصل شونده به ویتامین D (VDBP) و بخش کمی هم متصل به آلبومین در پلاسما حمل می‌شود. ویتامین D در جذب فعال کلسیم از روده و هوموستاز این یون نقش دارد. دو نوع مهم ویتامین D عبارتند از ویتامین D3 (Cholecalcilfrol) و ویتامین D2 (Ergocalciferol) که هر دو ساختار مشابهی دارند. ویتامین D3 غیر از طریق مواد غذایی، از طریق تابش خورشید به پوست بدن از مولکول پیش‌ساز خود نیز تولید می شود. در مقابل، ویتامین D2 عمدتاً از طریق مواد غذائی با منشا گیاهی وارد بدن می‌شود.

کیت الایزای ویتامین D یک روش الایزای رقابتی است و تمام مراحل آن در دمای اتاق انجام می گیرد. در این کیت، 25-OH VitaminD موجود در نمونه سرم یا پلاسما با 25-OH VitaminD نشاندار با بیوتین، برای اتصال به آنتی‌بادی اختصاصی کف چاهک رقابت می‌کند. پس از افزودن استانداردها و نمونه‌ها به چاهک‌ها، محلول استخراج (جهت جداسازی ویتامین D از پروتئین متصل‌شونده به آن) همراه با 25-OH VitaminD کونژوگه با بیوتین اضافه می‌شود. در این شرایط، هر چه مقدار 25-OH VitaminD در نمونه بیشتر باشد، 25-OH VitaminD بیوتینه کمتری به آنتی‌بادی کف چاهک متصل می‌گردد. پس از شستسو، استرپتوآویدین کونژوگه با آنزیم HRP جهت اتصال به بیوتین اضافه می‌شود. پس از شستشوی مجدد، محلول رنگزا (هیدروژن پراکسید و TMB) به چاهک‌ها، اضافه و بعد از متوقف سازی واکنش با اسید، رنگ پدیدآمده در طول موج 450 نانومتر قرائت می‌شود. شدت رنگ رابطه معکوسی با غلظت 25-OH VitaminD موجود در نمونه دارد.

مواد و وسایل مورد نیاز که در کیت موجود نمی باشد:

1- دستگاه خوانش میکروپلیت (پلیت ریدر)
2- سمپلر های 25 تا 1000 میکرولیتر
3- آب مقطر یا آب دیونیزه
4- کاغذ جاذب رطوبت

محتویات کیت:

1	VDK010-96-1	Vitamin D Coated Plate	1 Plate - 96 wells
2	VDK010-96-2	Standard 0 ng/ml (S1)	1 Vial - 0.5 ml
3	VDK010-96-3	Standard 10 ng/ml (S2)	1 Vial - 0.5 ml
4	VDK010-96-4	Standard 20 ng/ml (S3)	1 Vial - 0.5 ml
5	VDK010-96-5	Standard 40 ng/ml (S4)	1 Vial - 0.5 ml
6	VDK010-96-6	Standard 80 ng/ml (S5)	1 Vial - 0.5 ml
7	VDK010-96-7	Standard 120 ng/ml (S6)	1 Vial - 0.5 ml
8	VDK010-96-8	Control Serum1 6-18 ng/ml (C1)	1 Vial - 0.5 ml
9	VDK010-96-9	Control Serum2 30-50 ng/ml (C2)	1 Vial - 0.5 ml
10	VDK010-96-10	VitD-Biotin Conjugate (21X)	1 Vial - 0.7 ml
11	VDK010-96-11	Avidin-HRP Conjugate	1 Vial - 12 ml
12	VDK010-96-12	Extraction Buffer	1 Vial - 12 ml
13	VDK010-96-13	Washing Solution (25X)	1 Vial - 40 ml
14	VDK010-96-14	Chromogen Substrate	1 Vial – 12 ml
15	VDK010-96-15	Stop Solution	1 Vial -12 ml
16	VDK010-96-16	Card Board Sealer	1 PCS

نکات قابل توجه برای مصرف کننده:

1- سرم انسانی استفاده شده در کیت از نظر وجود HBs Ag, HCV و HIV منفی است. با این حال، رعایت موارد ایمنی در کار با مشتقات پلاسما یا سرم الزامی است.

2- محتویات این کیت برای مصرف در همین کیت است.

3- لازم است از تماس مستقیم با اجزای کیت پرهیز شود. در صورت تماس با محلول متوقف کننده، محل تماس را با آب فراوان بشویید.

4- از مخلوط کردن محتویات کیت با سری ساخت‌های مختلف بپرهیزید.

5- درب ظروف را پس از استفاده ببندید و از جابجایی دربها خودداری کنید.

6- کیت های باز شده حداکثر تا دو ماه در دمای 8-2 درجه سانتیگراد پایدار هستند.

7- توصیه می شود که بیشتر از 32 چاهک(4 استریپ) در هر مرحله کاری استفاده نشود. اگر پی‌پت به صورت دستی انجام می گیرد، پی‌پت کردن همه استانداردها، نمونه‌ها و کنترل‌ها باید در 5 دقیقه تمام شود. برای استفاده تمام میکروپلیت 96 تستی، باید از پی‌پتور اتوماتیک استفاده شود.

توضیحات عمومی :

1- قبل از شروع مراحل آزمایش تمام مواد و نمونه ها را به درجه حرارت اطاق رسانده و به آرامی تکان دهید تا کاملا یکنواخت شوند. بهتر است به محض شروع آزمایش کلیه مراحل بدون توقف انجام پذیرد.

2- از نوک سمپلر یکبار مصرف برای هر نمونه استفاده کنید.

3- پس از افزودن محلول متوقف کننده،جذب نوری چاهک ها سریعا قرائت شود.

4- برای کسب نتایج مطلوب باید شستشوی چاهکها به صورت کامل صورت گرفته و آخرین قطرات پس از شستشو از چاهکها تخلیه شوند.

5- از مهمترین فاکتورها در حصول نتیجه مطلوب، زمان انکوباسیون مناسب است، بنابراین پیشنهاد می‌گردد زمان انکوباسیون مراحل مختلف مطابق بروشور کیت رعایت شود.

آماده سازی و نگهداری معرف ها:

1- از فروبردن نوک سمپلر آغشته به مواد در محلول‌های کیت بخصوص محلول سوبسترا یا کونژوگه خودداری کنید. توصیه می شود مقدار مورد نیاز سوبسترا یا کونژوگه (مثلاً 0/9 میلی لیتر به ازای هر استریپ) را با نوک سمپلر تمیز از ظرف اصلی خارج و در لوله آزمایش تمیز بریزید و ظرف اصلی را به یخچال برگردانید.

2- آماده سازی و نگهداری محلول شستشو: در صورت مشاهده رسوب در محلول شستشو، آن را در بن ماری 37 درجه سانتی گراد قرار دهید تا رسوب حل شود. می توانید تمام محتوای محلول شستشو (40 میلی لیتر) را یکباره رقیق کنید. برای این کار 960 میلی لیتر آب مقطر کافی است. در صورت مشاهده کدورت در محلول شستشو از مصرف آن خودداری شود.

3- آماده سازی محلول بیوتین کونژوگه: محلول بیوتین کونژوگه در هنگام نیاز، باید 21 برابر با محلول استخراج رقیق گردد. لذا مقدار مورد نیاز آن را قبل از شروع کار، با محلول استخراج رقیق کنید (مثلاً 50 میکرولیتر از بیوتین کونژوگه و یک میلی‌لیتر محلول بافر استخراج در یک لوله آزمایش تمیز).

مراحل انجام آزمایش

1- مقدار 25 میکرولیتر از استانداردها، سرم‌های کنترل و نمونه‌های سرم را در چاهک‌های جداگانه ریخته و سپس مقدار 100 میکرولیتر از مخلوط بافر استخراج و کونژوگه بیوتین (آماده شده برای

مصرف) را به هر چاهک اضافه کنید. میکروپلیت را مدت 30 ثانیه به آرامی، شیک و پس از پوشاندن استریپ ها با نوار چسب، به مدت 30 دقیقه در دمای اتاق انکوبه کنید.

2- محتویات چاهکها را خالی نموده و چاهکها را 5 بار (300 میکرولیتر به ازای هر چاهک) با محلول شستشوی آماده مصرف بشویید. برای شستشو می توان از سمپلر 8 کاناله استفاده نمود. پس از شستشو، میکروپلیت را بطور وارونه، چندین بار بر روی یک پارچه یا کاغذ نمگیر ضربه بزنید تا قطرات اضافی محلول از آنها خارج گردد.
مقدار 100 میکرولیتر از محلول اویدین کونژوگه با HRP به هر چاهک اضافه کنید و به مدت 20 دقیقه در دمای اتاق انکوبه نمایید.

3- مجتویات چاهکها را خالی نموده و چاهکها را 5 بار مطابق مرحله قبل با محلول شستشوی آماده مصرف بشویید و قطرات باقیمانده را با ضربات روی یک پارچه یا کاغذ جاذب رطوبت خارج نمایید.

4- مقدار 100 میکرولیتر محلول سوبسترا به هر چاهک، اضافه و میکروپلیت را به مدت 15 دقیقه در دمای اطاق و تاریکی انکوبه نمایید.

5- با اضافه کردن 100 میکرولیتر محلول متوقف کننده به هر چاهک، واکنش های آنزیمی را متوقف نمایید. برای سنجش جذب نوری هر چاهک از دستگاه خوانش میکروپلیت با فیلتر 450 نانومتر استفاده نمایید. (توصیه می شود از فیلتر 630 نانومتر به عنوان فیلتر رفرانس استفاده گردد)

شرایط نگهداری:

1- دمای نگهداری کیت بین 8-2 درجه سانتیگراد است.
2- با توجه به انجام تست های Full Tern و Accelerate این کیت در صورت رعایت موارد و نگهداری صحیح تا 12 ماه پایدار می باشد.
3- میکروپلیت کوت شده را در کیسه مخصوص میکروپلیت همراه با نمگیر و در دمای 8-2 درجه سانتیگراد نگهداری نمایید.

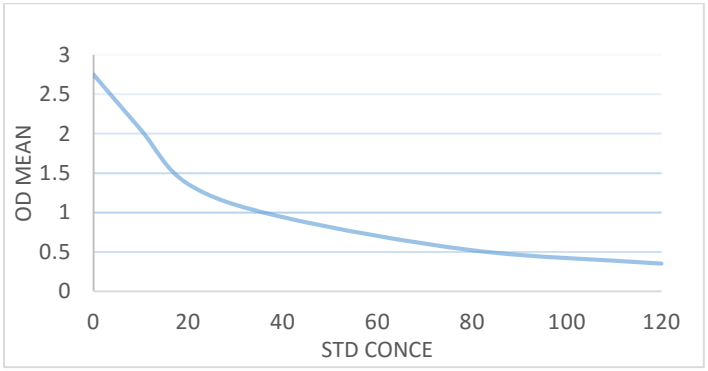
محاسبه نتایج:

1- جذب نوری استانداردها و نمونه‌ها را به کمک دستگاه الایزا ریدر در طول موج 450 نانومتر و در صورت امکان در مقابل فیلتر 630 نانومتر بخوانید.

2- با استفاده از میانگین جذب نوری استاندارد ها و غلظت آنها نمودار Point to Point رسم کنید، به این صورت که جذب نوری استاندارد را روی محور عمودی (Y) و غلظت آن ها را روی محور افقی (X) برده و نقطه تلاقی غلظت و جذب نوری را برای هر استاندارد به دست آورده و ادامه نقاط به دست آمده را به یکدیگر وصل نمایید تا منحنی به دست آید.

3- میانگین جذب نوری برای هر نمونه را بدست آورده و روی محور عمودی جای آن را پیدا کنید، سپس نقطه مذکور را توسط خطی به منحنی وصل نمایید بطوری که این خط کاملا بر محور عمودی عمود باشد و در ادامه از محل تلاقی خط و منحنی، خط عمود بر محور افقی وارد کنید، نقطه تلاقی این خط با محور افقی مقدار غلظت را نشان خواهد داد.

	Standards(ng/ml)	OD
STD 1	0	2.75
STD 2	10	2.05
STD 3	20	1.36
STD 4	40	0.94
STD 5	80	0.52
STD 6	120	0.35



توجه: جذب‌های نوری و منحنی مربوط فقط به عنوان نمونه می باشند و هر آزمایشگاه در هر انجام آزمایش باید منحنی جدیدی رسم نماید.

تهیه و جمع آوری نمونه :

1- آزمایش باید بر روی نمونه‌های سرم یا پلاسمای شفاف انجام گیرد. نمونه های شدیداً همولیز و دارای چربی باید حذف شون.
2- نمونه ها را می توان برای دو روز در دمای 2 تا 8 درجه سانتی گراد و برای زمان های طولانی تر (تا سی روز) در دمای 20- درجه سانتی گراد نگهداری نمود.
3- از انجماد و ذوب مکرر نمونه ها باید خود داری کرد.

مقادیر طبیعی و غیرطبیعی 25 هیدرواکسی ویتامین D:

≤ 20 ng/ml	Deficient
21-30 ng/ml	Insufficient
31 – 70 ng/ml	Preferred level
71 -100 ng/ml	High Level
>100 ng/ml	Toxic

شاخص های اجرایی:

1- اختصاصیت کیت (واکنش متقاطع): اختصاصیت این آزمایش با کمک مواد زیر جهت بررسی واکنش متقاطع با ویتامین D مورد آزمایش قرار گرفت که نتایج آن به شرح زیر می باشد:

25-OH Vitamin D3: 102.4%
25-OH Vitamin D2: 69.5%
1,25(OH)2 Vitamin D3: <0.1%
1.25(OH)2 Vitamin D2: <0.1%
Vitamin D3: 3.8%
Vitamin D2: 3.2%

2- دقت آزمایش:
آزمایش های Intra Assay (همخوانی غلظت مشخص از یک نمونه در یک سری آزمایش) و Inter Assay (همخوانی غلظت مشخص از یک نمونه در سری آزمایش های مختلف) با استفاده از غلظت های مختلف ویتامینD انجام گردید که در جداول 1 و 2 آمده است.

جدول شماره 1 Intra Assay :

CV%	Mean ng/ml	Number of repetitions	Sample
4.7	7	5	1
5.1	19	5	2
4.5	42	5	3

جدول شماره 2 Inter Assay :

CV%	Mean ng/ml	Number of repetitions	Sample
8.3	6	5	1
5.2	10.9	5	2
4.1	22.5	5	3

3- آزمایش مقایسه ای:
150 سرم بیمار که توسط کیت LIASON مورد ارزیابی قرار گرفته بودن با این کیت مقایسه گردیدند که نتایج آن در جدول زیر آمده است:

	70<	70 - 30	30>	تعداد کل
Zist Tolid Razi	4	98	48	150
LIASON	5	96	49	150

شرکت زیست تولید رازی
ایران، کرمانشاه، شهرک صنعتی بیستون، خیابان دکتر محمد کرمانشاهی، مرکز زیستفناوری کاربردی.
تلفن شرکت: 988337108376+ ایمیل: appliedbiocenter@gmail.com
سایت:www.razibiotech.com