

کیت تشخیصی میزان سایتوکین IL-6 انسانی (صرفاً برای بررسی در تحقیقات)

محتویات کیت: ۱. پلیت کوت شده با آنتی بادی ضد IL-6 انسانی (CN: KPG-HI6P)، ۲. استانداردهای شماره ۱-۳ (CN: KPG-HI6S1-3)، ۳. آنتی بادی کونژوگه (CN: KPG-HI6D)، ۴. (CN: KPG-HA) HRP-Avidin، ۵. سوبسترا (CN: KPG-SU)، ۶. محلول متوقف کننده (CN: KPG-ST)، ۷. محلول شستشو 10X (CN: KPG-WB)

مواد مورد نیاز که در کیت وجود ندارد: ۱. دستگاه الیزا ریدر، ۲. آب مقطر استریل دوبار تقطیر، ۳. انواع سمپلر و سرسمپلر

نمونه مورد استفاده: آنتی بادی های مورد استفاده شده در این کیت قادر به شناسایی IL-6 در نمونه سرم، پلاسما، مایع مغزی-نخاعی و سوپرناتانت کشت سلولی می باشند.

توضیحی کوتاه در خصوص IL-6:

IL-6 سایتوکینی التهابی است که عمدتاً توسط ماکروفاژها تولید می شود. این سایتوکین، دارای خواص التهابی فراوانی است و نقش آن بر علیه عفونت های باکتریال، ویرال و قارچی به خوبی مشخص شده است. از طرفی این سایتوکین در ایجاد بیماری های با واسطه ایمنی سلولار نیز نقش زیادی دارد. بنابراین این سایتوکین به عنوان یک شاخص التهابی کاربرد فراوانی در مطالعات آزمایشگاهی برای بررسی وضعیت یک بیماری و یا اثرات التهابی و یا ضد التهابی یک دارو دارا می باشد. کیت حاضر با استفاده از آنتی بادی های مونوکلونال ضد IL-6 انسانی طراحی و تولید شده است، بنابراین در اندازه گیری موارد مشابه حیوانی کاربرد ندارد.

نحوه آماده سازی استاندارد:

استانداردهای موجود موجود در کیت آماده کار و دارای ۲۰۰ پیکوگرم بر میلی لیتر از سایتوکین IL-6 برای استاندارد شماره ۳ (CN: KPG-HI6S3)، ۱۰۰ پیکوگرم بر میلی لیتر از سایتوکین IL-6 برای استاندارد شماره ۲ (CN: KPG-HI6S2) و ۰ پیکوگرم بر میلی لیتر از سایتوکین IL-6 برای استاندارد شماره ۱ (CN: KPG-HI6S1) می باشد.

حساسیت کیت حاضر به میزان ۳ پیکوگرم بر میلی لیتر و دقت آن $3\% < \text{Intra assay}$ ، $9\% < \text{Inter assay}$ می باشد.

نحوه آماده سازی محلول ها

تمامی محلول های موجود در کیت آماده کار می باشند به جز محلول شستشو (Washing Buffer) که می بایست قبل از کار ۱۰ برابر رقیق شود.

نحوه کار با کیت برای اندازه گیری IL-6

برای اندازه گیری IL-6 در نمونه مورد بررسی موارد زیر را به ترتیب و بدون تغییر انجام دهید:

۱. پلیت را از بسته مورد نظر خارج کرده و در محیطی خشک به دمای اتاق برسانید. در ادامه به ویال A1 به میزان ۵۰ میکرولیتر از استاندارد شماره ۳ (استاندارد (CN: KPG-HI6S3)) با غلظت ۲۰۰ پیکوگرم بر میلی لیتر، به ویال B1 به میزان ۵۰ میکرولیتر از استاندارد شماره ۲ (۱۰۰ پیکوگرم بر میلی لیتر (CN: KPG-HI6S2)) و به ویال C1 به میزان ۵۰ میکرولیتر از استاندارد شماره ۱ (۰ پیکوگرم بر میلی لیتر (CN: KPG-HI6S1)) اضافه کنید.
۲. به باقی ویال ها به میزان ۵۰ میکرولیتر نمونه مورد نظر را اضافه و به مدت ۲ ساعت بر روی شیکر (دور 180 RPM) انکوبه کنید.
۳. بعد از انکوباسیون مناسب، با استفاده از محلول شستشو پلیت ها را ۳ مرتبه شستشو دهید. دقت داشته باشید که محلول شستشو در غلظت 10X تهیه شده است. بنابراین قبل از شستشو، محلول شستشو را با آب مقطر دوبار تقطیر ۱۰ برابر رقیق نمایید. دقت داشته باشید که بعد از اضافه کردن محلول شستشو، پلیت ها را به مدت تقریبی ۱ دقیقه دردمای اتاق انکوبه کنید و سپس تخلیه نمایید. بعد از تخلیه محلول شستشو، در صورت استفاده از روش دستی، پلیت ها را با ضربه زدن بر روی دستمال کاغذی به خوبی تخلیه نمایید.



<http://kpgene.ir>



@karmaniaparsgene1



09132926113



info@kpgene.ir



karmaniaparsgene

۴. به میزان ۵۰ میکرولیتر از آنتی بادی کونژوگه به تمامی حفره ها اضافه کنید و به مدت ۱ ساعت بر روی شیکر (دور 180 RPM) انکوبه کنید.
۵. بعد از انکوباسیون مناسب، با استفاده از محلول شستشو پلیت ها را ۳ مرتبه شستشو دهید. بعد از تخلیه محلول شستشو، در صورت استفاده از روش دستی، پلیت ها را با ضربه زدن بر روی دستمال کاغذی به خوبی تخلیه نمایید.
۶. به میزان ۵۰ میکرولیتر از محلول HRP-Avidin به تمامی حفره ها اضافه کنید و به مدت نیم ساعت بر روی شیکر (دور 180 RPM) انکوبه کنید.
۷. بعد از انکوباسیون مناسب، با استفاده از محلول شستشو پلیت ها را ۵ مرتبه شستشو دهید. دقت داشته باشید که بعد از اضافه کردن محلول شستشو، پلیت ها را به مدت تقریبی ۱ دقیقه دردمای اتاق انکوبه کنید و سپس تخلیه نمایید. بعد از تخلیه محلول شستشو، در صورت استفاده از روش دستی، پلیت ها را با ضربه زدن بر روی دستمال کاغذی به خوبی تخلیه نمایید.
۸. به میزان ۵۰ میکرولیتر از سوبسترا به تمامی حفره ها اضافه کنید و به مدت ۵ دقیقه در دمای اتاق و بر روی شیکر انکوبه کنید. دقت نمایید که زمان ۵ دقیقه برای انکوباسیون کافی است و بیشتر از این میزان موجب نزدیک شدن OD استانداردها به یکدیگر خواهد شد.
۹. به میزان ۲۵ میکرولیتر از محلول متوقف کننده به تمامی حفره ها اضافه کنید و میزان جذب نمونه ها در دستگاه الیزا ریدر در طول موج ۴۵۰ نانومتر مورد اندازه گیری قرار گیرد.

اشکالات احتمالی در روند کار با کیت و نحوه برطرف کردن آن ها

کیت های شرکت کارمانیا پارس ژن چندین بار مورد کنترل کیفی قرار می گیرند و احتمال اشتباه در خوانش استاندارد ها به میزان زیادی کاهش پیدا کرده است. با این وجود در برخی موارد ممکن است، همانگونه که انتظار می رود، استانداردها به همان ترتیبی که میزان رقت آن کاهش می یابد، میزان جذب نوری آن کم نشود. این خطا به چند دلیل ممکن است ایجاد شود. اولین و مهمترین دلیل آن شستشو نامناسب حفره ها است. در صورت شستشو نامناسب و باقی ماندن مواد از مرحله قبل، مانند نمونه، از اتصال صحیح مواد مرحله بعدی به پلیت، مانند آنتی بادی کونژوگه، جلوگیری می شود و این آنتی بادی ها در مرحله شستشو بعدی از حفره ها حذف می شوند. شستشو نامناسب حتی ممکن است منجر به این شود که استاندارد ها هیچگونه تفاوت جذبی نداشته باشند و همگی به یک میزان رنگ تولید کنند. دومین دلیل احتمالی، آماده سازی نامناسب استانداردها و یا استفاده از استاندارد دی که از آماده سازی آن زمانی بیش از ۲ ساعت گذشته باشد. سایتوکین ها مولکول هایی ناپایدار می باشند و برای اندازه گیری آن ها بایستی استاندارد به صورت تازه و در زمان نیاز آماده شود. استفاده از سمپلرهای غیر استاندارد به دلیل دقت کم نیز می تواند دلیلی دیگر بر این ادعا باشد. استفاده از محلول هایی غیر از محلول های تعویبه شده در کیت (مانند استفاده از محلول شستشو از کیت های دیگر) به شدت بر میزان دقت و حساسیت کیت تاثیر گذار می باشد. بنابراین از به کار بردن محلول هایی غیر از محلول های شرکت کارمانیا پارس ژن خودداری فرمایید. در برخی مواقع میزان OD استاندارد صفر ممکن است بیش از عدد ۰/۰۹ باشد. دلیل احتمالی این امر عدم شستشوی مناسب باشد. برای رفع این مشکل بهتر است بعد از اضافه کردن محلول شستشو، پلیت را به مدت ۱ دقیقه بر روی شیکر قرار دهید سپس تخلیه نمایید. همچنین می توان پایین ترین OD مربوط به نمونه ها را به عنوان صفر برای دستگاه تعریف کرد تا تمامی نمونه ها در رنج قابل اندازه گیری قرار بگیرند.

نکته مهم: با توجه به اینکه سطح سرمی سایتوکین ها در جوامع مختلف با یکدیگر متفاوت است، بنابراین در صورتی که از این کیت برای بررسی سطح سرمی بیمار مبتلا به COVID-19 استفاده می شود، دقت نمایید که برای تعیین ایندکس درمان ضد IL-6 و یا گیرنده آن بایستی ابتدا ۵ تا ۱۰ نمونه سرم از افراد سالم از نظر سطح سرمی IL-6 با این کیت مورد بررسی قرار گیرند سپس در صورتی که بیمار سطح سرمی ۲ یا ۳ برابر افراد سالم داشته باشد و با داده های بالینی مطابقت داشته باشد، پیشنهاد درمان بر علیه IL-6 و یا گیرنده آن داده شود.



<http://kpgene.ir>



09132926113



@karmaniaparsgene1



info@kpgene.ir



karmaniaparsgene