

### کیت تشخیصی میزان سایتوکین IL-10 انسانی (صرفاً برای بررسی در تحقیقات)

#### • محتویات کیت:

۱. پلیت کوت شده با آنتی بادی ضد IL-10 انسانی (CN: KPG-HI10P)، ۲. استاندارد (CN: KPG-HI10S)، ۳. استاندارد صفر (CN: KPG-HI10Sz)، ۴. آنتی بادی کونژوگه (CN: KPG-HI10D)، ۵. HRP-Avidin (CN: KPG-HA)، ۶. سوبسترا (CN: KPG-SU)، ۷. محلول متوقف کننده (CN: KPG-ST)، ۸. محلول شستشو 10X (CN: KPG-WB)، ۹. بافر رقیق کننده (CN: KPG-EB)

• **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-10 در نمونه سرم، پلاسما، مایع مغزی-نخاعی و سوپرناتانت کشت سلولی می باشند.

#### • توضیحی کوتاه در خصوص IL-10:

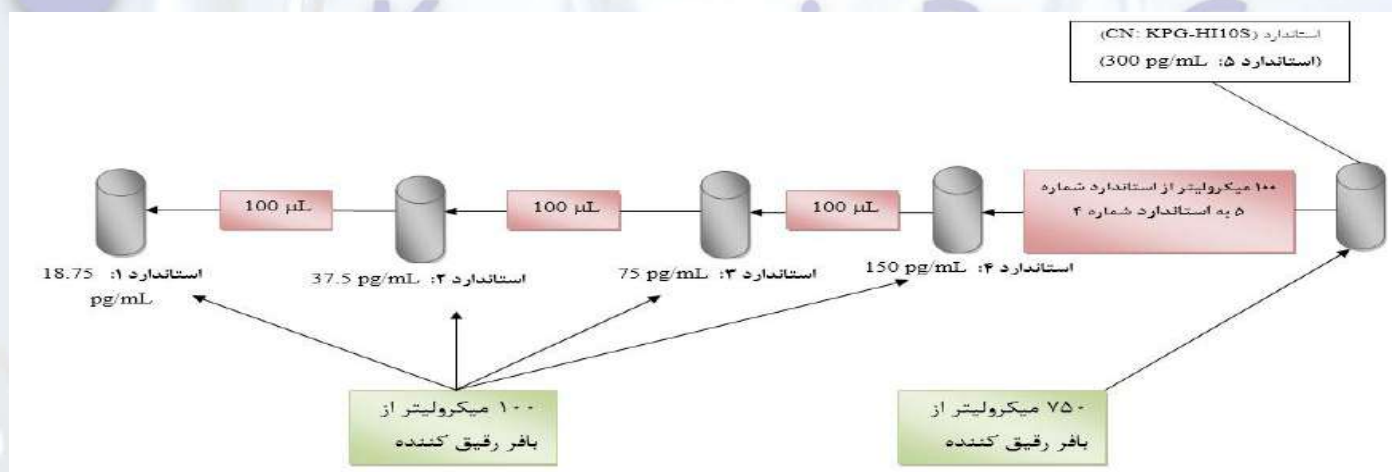
IL-10 سایتوکینی ضد التهابی است که توسط تعداد زیادی از سلول های ایمنی از جمله لنفوسیت های T تنظیم کننده و ماکروفاژها تولید می شود. این سایتوکین، دارای خواص ضد التهابی فراوانی است و بر روی تعداد یادی از سلول های ایمنی دارای گیرنده می باشد. از این رو قادر به تنظیم و سرکوب پاسخ رنج وسیعی از فعالیت های سیستم ایمنی می باشد. IL-10 نقش مهمی در ایجاد هونوستاز به دنبال عفونتهای میکروبی و همچنین جلوگیری از ایجاد بیماری های خود ایمنی می باشد. بنابراین این سایتوکین به عنوان یک شاخص ضد 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-10 انسانی طراحی و تولید شده است، بنابراین در اندازه گیری موارد مشابه حیوانی کاربرد ندارد.

#### • نحوه آماده سازی استاندارد:

➤ ابتدا ۴ ویال ۵۰۰ میکرولیتری استریل آماده نموده و به ویال ها به میزان ۱۰۰ میکرولیتر از بافر رقیق کننده (Elution buffer) اضافه نمایید. در ادامه این ویال ها را با نام استاندارد شماره ۱ تا ۴ نامگذاری کنید.

➤ در ادامه به میزان ۷۵۰ میکرولیتر به ویال حاوی استاندارد (CN: KPG-HI10S) بافر رقیق کننده اضافه نموده و سپس به مدت ۱۰ دقیقه در دمای محیط انکوبه کنید. محلول ایجاد شده دارای ۳۰۰ پیکوگرم بر میلی لیتر از سایتوکین IL-10 می باشد و استاندارد شماره ۵ کیت محسوب می شود.

۱. مطابق شکل زیر، به میزان ۱۰۰ میکرولیتر از ویال استاندارد شماره ۵ (CN: KPG-HI10S) به استاندارد شماره ۴ منتقل کرده و به شدت مخلوط کرده و به مدت ۳ دقیقه انکوبه کنید. این عمل را تا استاندارد شماره ۱ ادامه دهید. دقت داشته باشید که برای رسیدن به جواب بهینه، انکوباسیون ۳ دقیقه ای حتما رعایت شود. در این حالت استاندارد شماره ۴ دارای غلظت ۱۵۰، استاندارد شماره ۳ دارای غلظت ۷۵، استاندارد شماره ۲ دارای غلظت ۳۷/۵ و استاندارد شماره ۱ دارای غلظت ۱۸/۷۵ پیکوگرم بر میلی لیتر می باشند. دقت داشته باشید که استاندارد صفر (CN: KPG-HI10Sz) در کیت به طور جداگانه وجود دارد. •



دقت نمایید که پس از آماده سازی استاندارد فقط به مدت ۸ ساعت پایداری دارد و قابل نگه داری نیست. حساسیت کیت حاضر به میزان ۲ پیکوگرم بر میلی لیتر و دقت آن  $\text{Intra assay} < 3\%$ ،  $\text{Inter assay} < 8\%$  می باشد.



## • نحوه کار با کیت برای اندازه گیری IL-10

برای اندازه گیری IL-10 در نمونه مورد بررسی موارد زیر را به ترتیب و بدون تغییر انجام دهید:

1. پلیت را از بسته مورد نظر خارج کرده و در محیطی خشک به دمای اتاق برسانید. به چاهک A1 به میزان ۵۰ میکرولیتر از استاندارد شماره ۵ (۳۰۰ پیکوگرم بر لیتر)، به چاهک B1 به میزان ۵۰ میکرولیتر از استاندارد شماره ۴ (۱۵۰ پیکوگرم بر میلی لیتر)، به چاهک C1 به میزان ۵۰ میکرولیتر از استاندارد شماره ۳ (۷۵ پیکوگرم بر میلی لیتر)، به چاهک D1 به میزان ۵۰ میکرولیتر از استاندارد شماره ۲ (۳۷/۵ پیکوگرم بر میلی لیتر)، به چاهک E1 به میزان ۵۰ میکرولیتر از استاندارد شماره ۱ (۱۸/۷۵ پیکوگرم بر میلی لیتر) و به چاهک F1 به میزان ۵۰ میکرولیتر از استاندارد صفر (CN: KPG-HI10Sz) که از قبل در کیت وجود دارد اضافه کنید.
2. به میزان ۵۰ میکرولیتر به باقی ویال ها نمونه مورد نظر را اضافه کنید و به مدت ۲ ساعت بر روی شیکر (حداقل در دور RPM ۲۰۰) انکوبه کنید.
3. 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.
4. به میزان ۵۰ میکرولیتر از آنتی بادی کونژوگه به تمامی حفره ها اضافه کنید و به مدت ۱ ساعت بر روی شیکر (حداقل در دور RPM ۲۰۰) انکوبه کنید.
5. بعد از انکوباسیون مناسب، با استفاده از محلول شستشو پلیت ها را ۳ 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.
6. به میزان ۵۰ میکرولیتر از محلول HRP-Avidin به تمامی حفره ها اضافه کنید و به مدت نیم ساعت بر روی شیکر (حداقل در دور RPM ۲۰۰) انکوبه کنید.
7. 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.
8. به میزان ۵۰ میکرولیتر از سوبسترا به تمامی حفره ها اضافه کنید و به مدت ۱۵ دقیقه در دمای اتاق انکوبه کنید. دقت نمایید در صورتی که شدت ایجاد رنگ به دلیل بالا بودن غلظت IL-10 در نمونه شما زیاد باشد، مدت انکوباسیون را کاهش دهید.
9. 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 ی که از آماده سازی آن زمانی بیش از ۶ 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 سمپلهای 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. عدم استفاده از شیکر به شدت بر میزان حساسیت کیت تاثیر گذار است. دقت نمایید در طول انکوباسیون ها با پوشاندن پلیت ها از خشک شدن نمونه ها جلوگیری کنید.



<http://kpgene.ir>



@karmaniaparsgene1



karmaniaparsgene



09132926113



info@kpgene.ir