بسمه تعالی

کیت تشخیصی میزان سایتوکین IL-17A انسانی (صرفا برای بررسی در تحقیقات)

- **محتویات کیت:**

۱. پلیت کوت شده با آنتی بادی ضد IL-17A انسانی (CN: KPG-HI17P)، ۲. استاندارد (CN: KPG-HI17S)، ۳. استاندارد صفر ($CN: KPG-HI17S_{zero}$)، ۴. آنتی بادی کونژوگه (CN: KPG-HI17D)، 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-17A در نمونه سرم، پلاسما، مایع مغزی-نخاعی و سوپرناتانت کشت سلولی می باشند.

- **توضیحی کوتاه درخصوص IL-17A:** IL-17A سایتوکینی التهابی است که توسط لنفوسیت های T کمکی نوع ۱۷ (Th17) تولید می شود. این سایتوکین، دارای خواص التهابی فراوانی است و بر روی تعداد یادی از سلول های ایمنی دارای گیرنده می باشد. از این رو قادر به تنظیم و القا پاسخ در سلول های سیستم ایمنی می باشد. IL-17A نقش مهمی در ایجاد پاسخ سیستم ایمنی بر علیه عفونت های باکتریال و قارچی دارا می باشد. این سایتوکین یکی از عوامل اصلی درگیر در ایجاد بیماری های خود ایمنی می باشد. بنابراین این سایتوکین به عنوان یک شاخص التهابی کاربرد فراوانی در مطالعات آزمایشگاهی برای بررسی وضعیت بیماری های خود ایمنی دارا می باشد. کیت حاضر با استفاده از آنتی بادی های مونوکلونال ضد IL-17A انسانی طراحی و تولید شده است، بنابراین در اندازه گیری موارد مشابه حیوانی کاربرد ندارد.

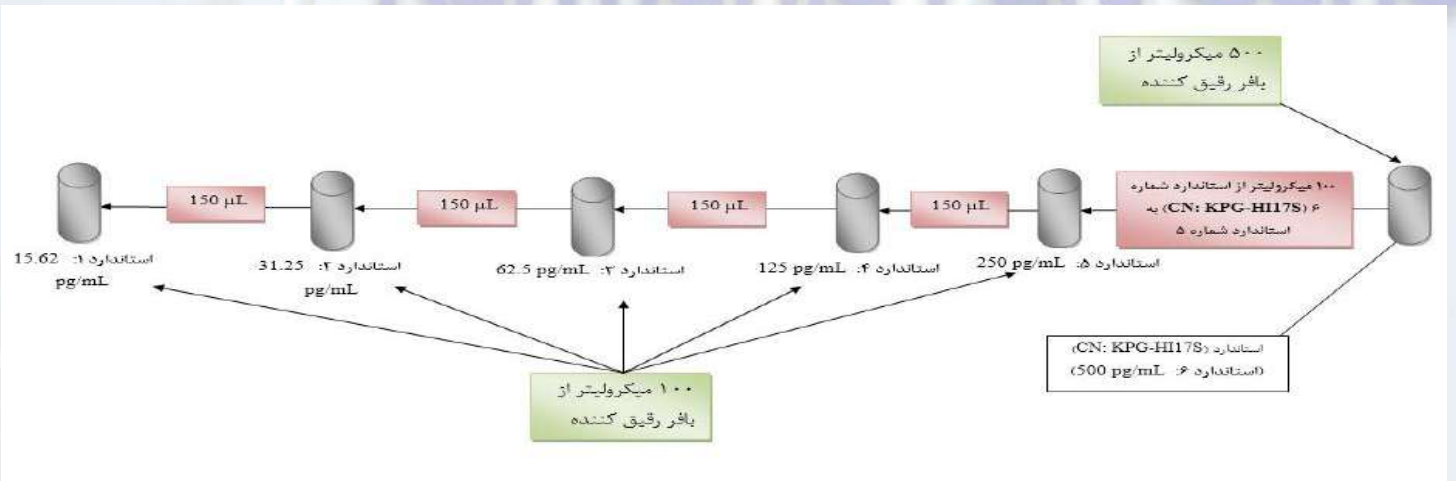
- **نحوه آماده سازی استاندارد:**

- ابتدا به میزان ۵۰۰ میکرولیتر به ویال حاوی استاندارد اولیه از محلول رقیق کننده (Elution buffer) اضافه نموده و سپس به مدت ۱۰ دقیقه در دمای محیط انکوبه کنید تا استاندارد شماره ۶ شما با غلظت ۵۰۰ پیکوگرم بر لیتر آماده کار شود. دقت نمایید که بعد از محلول کردن استاندارد و خارج نمودن از حالت لیوفلیزه، بایستی در همان موقع مورد استفاده قرار گیرد و قابل نگهداری نمی باشد.

- برای آماده سازی استانداردهای شماره ۵، ۴، ۳، ۲ و ۱ به ترتیب زیر عمل نمایید:

I. ابتدا ۵ ویال ۵۰۰ میکرولیتری استریل آماده نموده و به ویال ها به میزان ۱۰۰ میکرولیتر از بافر رقیق کننده اضافه نمایید در ادامه این ویال ها را با نام استاندارد شماره ۱ تا ۵ نامگذاری کنید.

II. مطابق شکل زیر، به میزان ۱۰۰ میکرولیتر از ویال استاندارد شماره ۶ (CN: KPG-HI17S) که حاوی ۵۰۰ پیکوگرم بر لیتر از IL-17A می باشد، به استاندارد شماره ۵ منتقل کرده و به شدت مخلوط کرده و به مدت ۳ دقیقه انکوبه کنید. این عمل را تا ویال شماره ۱ ادامه دهید. دقت داشته باشید که برای رسیدن به جواب بهینه، انکوباسیون ۳ دقیقه ای حتما رعایت شود. در این حالت ویال شماره ۵ دارای غلظت ۲۵۰، استاندارد شماره ۴ دارای غلظت ۱۲۵، استاندارد شماره ۳ دارای غلظت ۶۲/۵، استاندارد شماره ۲ دارای غلظت ۳۱/۲۵، استاندارد شماره ۱ دارای غلظت ۱۵/۶۲ پیکوگرم بر میلی لیتر می باشد. استاندارد صفر ($CN: KPG-HI17S_{zero}$) از قبل در کیت به صورت آماده موجود می باشد. دقت نمایید درصورتی که میزان سایتوکین نمونه شما کم می باشد و نیاز به استاندارد های با غلظت کمترداریدروند رقیق سازی را یک مرحله بیشتر انجام دهید.



http://kpgene.ir
09132926113
@karmaniaparsgene1
info@kpgene.ir
karmaniaparsgene

حساسیت کیت حاضر به میزان ۲ پیکوگرم بر میلی لیتر و دقت آن Inter assay< %9, Intra assay< %3 می باشد.

نحوه کار با کیت برای اندازه گیری IL-17A

برای اندازه گیری IL-17A 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. به ویال A1 تا G1 به ترتیب به میزان ۵۰ میکرولیتر از استاندارد های شماره ۶ تا صفر اضافه کنید.

۲. 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) و در دمای ۳۷ درجه سانتیگراد انکوبه کنید. دقت نمایید که اگر شیکر شما مجهز به **دمای ۳۷** درجه نیست، پلیت را به مدت ۳ ساعت بر روی شیکر در دمای اتاق انکوبه کنید. رعایت زمان انکوباسیون و دور شیکر بسیار اهمیت دارد.

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.

۴. به میزان ۵۰ میکرولیتر از آنتی بادی کونژوگه به تمامی حفره ها اضافه کنید و به مدت ۱ ساعت در **دمای ۳۷** و بر روی شیکر (حداقل در دور RPM ۲۰۰) انکوبه کنید. دقت نمایید که اگر شیکر شما مجهز به دمای ۳۷ درجه نیست، پلیت را به مدت ۹۰ دقیقه بر روی شیکر در دمای اتاق انکوبه کنید.

۵. 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.

۶. به میزان ۵۰ میکرولیتر از محلول HRP-Avidin به تمامی حفره ها اضافه کنید و به مدت نیم ساعت در **دمای اتاق** و بر روی شیکر (حداقل در دور RPM ۲۰۰) انکوبه کنید. دقت نمایید که در این مرحله نیاز به دمای ۳۷ درجه نیست.

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.

۸. به میزان ۵۰ میکرولیتر از سوبسترا به تمامی حفره ها اضافه کنید و به مدت ۱۵ دقیقه در **دمای اتاق** انکوبه کنید.

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 استاندراد 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. درصورت 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 استانداردی 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 سمپلرهای غیر استاندارد به دلیل دقت کم نیز می تواند دلیلی دیگر بر این ادعا باشد. استفاده از محلول هایی غیر از محلول های تعویه 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 کاربردن 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. در طول کار به ویژه بعد از شستشو از خشک شدن پلیت به طور جدی اجتناب کنید و تمام مراحل پشت سر هم و بدون وقفه انجام شود زیرا خشک شدن پلیت ها به شدت بر کیفیت کیت اثر گذار می باشد.