بسمه تعالی

کیت تشخیصی میزان سایتوکین TGF-β موشی/انسانی(صرفا برای بررسی در تحقیقات)

۱. **محتویات کیت:** ۱. پلیت کوت شده با آنتی بادی ضد TGF-β انسانی (CN: KPG-HTGFP)، ۲. استاندارد (CN: KPG-HTGFS)، ۳. استاندارد صفر (CN: KPG-SZ)، ۴. آنتی بادی کونژوگه (CN: KPG-HTGFD)، 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 TGF-β در نمونه سرم، پلاسما، مایع مغزی-نخاعی و سوپرناتانت کشت سلولی موش و انسان می باشند.

- **توضیحی کوتاه درخصوص TGF-β:**

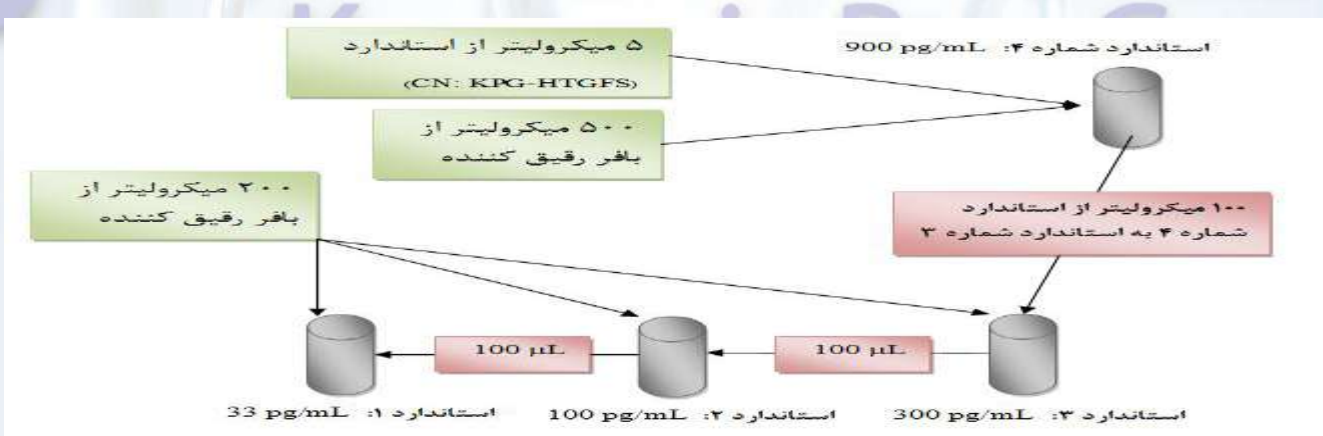
TGF-β سایتوکینی ضد التهابی است که توسط تعداد زیادی از سلول های ایمنی از جمله لنفوسیت های T تنظیم کننده و ماکروفاژها تولید می شود. این سایتوکین، دارای خواص ضد التهابی فراوانی است و بر روی تعداد یادی از سلول های ایمنی دارای گیرنده می باشد. با وجود خواص ضد التهابی، این سایتوکین در رشد و بلوغ لنفوسیت های Th17 نقش مهمی ایفا می کند. بنابراین این سایتکین به همراه سایتوکین های IL-2 و IL-6 می تواند نقش التهابی نیز ایفا کند. TGF-β دارای نقش مهمی در ایجاد هوئوستاز به دنبال عفونتهای میکروبی و همچنین جلوگیری از ایجاد بیماری های خود ایمنی می باشد. بنابراین این سایتوکین به عنوان یک شاخص عمدتا 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 TGF-β موشی و انسانی طراحی و تولید شده است، بنابراین در اندازه گیری موارد مشابه حیوانی کاربرد ندارد.

- **نحوه آماده سازی استاندارد:**

- ابتدا یک لوله استریل آماده کرده و به آن به میزان ۵۰۰ میکرولیتر بافر رقیق کننده اضافه نمایید و مطابق شکل زیر، به میزان ۵ میکرولیتر از استاندارد (CN: KPG-HTGFS) به آن اضافه نمایید. به خوبی محلول داخل لوله را مخلوط کرده و به مدت ۱۰ دقیقه در دمای اتاق انکوبه کنید و نام آن را استاندارد شماره ۴ بگذارید که حاوی ۹۰۰ پیکوگرم از TGF-β می باشد.

- در ادامه ۳ ویال ۵۰۰ میکرولیتری استریل آماده نموده و به هر ویال ها ۲۰۰ میکرولیتر از بافر رقیق کننده اضافه نمایید. این ویال ها را با نام استاندارد شماره ۱ تا ۳ نامگذاری نمایید.

- در ادامه ۱۰۰ میکرولیتر از استاندارد شماره ۴ به استاندارد شماره ۳ 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 استاندارد شماره ۴ دارای غلظت ۹۰۰، استاندارد شماره ۳ دارای غلظت ۳۰۰، استاندارد شماره ۲ دارای غلظت ۱۰۰ و استاندارد شماره ۱ دارای غلظت ۳۳ پیکوگرم بر میلی لیتر می باشد. استاندارد صفر (CN: KPG-SZ) از قبل در کیت آماده می باشد.



حساسیت کیت حاضر به میزان ۶ پیکوگرم بر میلی لیتر و دقت آن Inter assay< %9, Intra assay< %3 می باشد.

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

- **نحوه آماده سازی نمونه:**

TGF-β موجود در نمونه سرم/پلاسما و بافت انسان یا موش بایستی ابتدا با اسید فعال شده سپس توسط این کیت مورد اندازه گیری قرار بگیرد. به این منظور برای فعال سازی TGF-β نمونه بافت یا سرم طبق پروتوکول زیر عمل کنید:

- فعال سازی TGF-β بافت: ابتدا نمونه بافت را کامل هموژنیزه کرده در ادامه به میزان ۵۰ میکرولیتر از سوپرناتانت نمونه را با ۱۰ میکرولیتر از اسید HCL یک نرمال (1N HCL) به مدت ۱۰ دقیقه در دمای محیط انکوبه کنید و در ادامه با ۱۰ میکرولیتر از NaOH یک نرمال (1N NaOH) خنثی کنید. در این حالت نمونه آماده بررسی با کیت حاظر می باشد. دقت نمایید در انتها غلظت به دست آمده برای هر نمونه در عدد ۱/۴ ضرب شود تا غلظت نهایی نمونه محاسبه شود.

- فعال سازی TGF-β سرم یا پلاسما: ۵۰ میکرولیتر از نمونه سرم یا پلاسما را با ۱۰ میکرولیتر از اسید HCL یک نرمال (1N HCL) به مدت ۱۰ دقیقه در دمای محیط انکوبه کنید و در ادامه با ۱۰ میکرولیتر از NaOH یک نرمال (1N NaOH) خنثی کنید. در این حالت نمونه آماده بررسی با کیت حاظر می باشد. دقت نمایید در انتها غلظت به دست آمده برای هر نمونه در عدد ۱/۴ ضرب شود تا غلظت نهایی نمونه محاسبه شود. دقت کنید که این مراحل برای آماده سازی استاندارد مورد نیاز نیست و فقط بر روی نمونه بایستی انجام شود.

- **نحوه کار با کیت برای اندازه گیری TGF-β**

۱. پلیت را از بسته مورد نظر خارج کرده و در محیطی خشک به دمای اتاق برسانید.

۲. به چاهک A1 به میزان ۵۰ میکرولیتر از استاندارد شماره ۴ (۹۰۰ پیکوگرم بر میلی لیتر)، به چاهک B1 به میزان ۵۰ میکرولیتر از استاندارد شماره ۳ (۳۰۰ پیکوگرم بر میلی لیتر)، به چاهک C به میزان ۵۰ میکرولیتر از استاندارد شماره ۲ (۱۰۰ پیکوگرم بر میلی لیتر)، به چاهک D به میزان ۵۰ میکرولیتر از استاندارد شماره ۱ (۳۳ پیکوگرم بر میلی لیتر) و به چاهک E1 به میزان ۵۰ میکرولیتر از استاندارد صفر (CN: KPG-SZ) اضافه کنید.

۳. به میزان ۵۰ میکرولیتر به باقی ویال ها نمونه مورد نظر را اضافه و به مدت ۲ ساعت بر روی شیکر انکوبه کنید. دقت نمایید که تمامی مراحل بایستی حتما بر روی شیکر انکوبه شوند.

۴. بعد از انکوباسیون مناسب، با استفاده از محلول شستشو پلیت ها را ۳ مرتبه شستشو دهید. محلول شستشو در غلظت 10X تهیه شده است، بنابراین قبل از شستشو، محلول شستشو را با آب مقطر دوبار تقطیر ۱۰ برابر رقیق نمایید. بعد از اضافه کردن محلول شستشو، پلیت ها را به مدت تقریبی ۱ دقیقه دردمای اتاق انکوبه کنید و سپس تخلیه نمایید.

۵. به میزان ۵۰ میکرولیتر از آنتی بادی کونژوگه به تمامی حفره ها اضافه کنید و به مدت ۱ ساعت در دمای اتاق انکوبه کنید.

۶. 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.

۷. به میزان ۵۰ میکرولیتر از محلول HRP-Avidin به تمامی حفره ها اضافه کنید و به مدت نیم ساعت در دمای اتاق انکوبه کنید.

۸. 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.

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

۱۰. 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:** خطاها به چند دلیل ممکن است ایجاد شوند. 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 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 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. 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 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.

Karmania Pars Gene