بسمه تعالی

کیت تشخیصی میزان سایتوکین TNF-α انسانی (صرفا برای بررسی در تحقیقات)

محتویات کیت:

۱.پلیت کوت شده با آنتی بادی ضد TNF-α انسانی (CN: KPG-HTNFP)، ۲. استاندارد (CN: KPG-HTNFS)، ۳. استاندارد صفر (CN: KPG-HTNFSz)، ۴. آنتی بادی کونژوگه (CN: KPG-HTNFD)، 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:

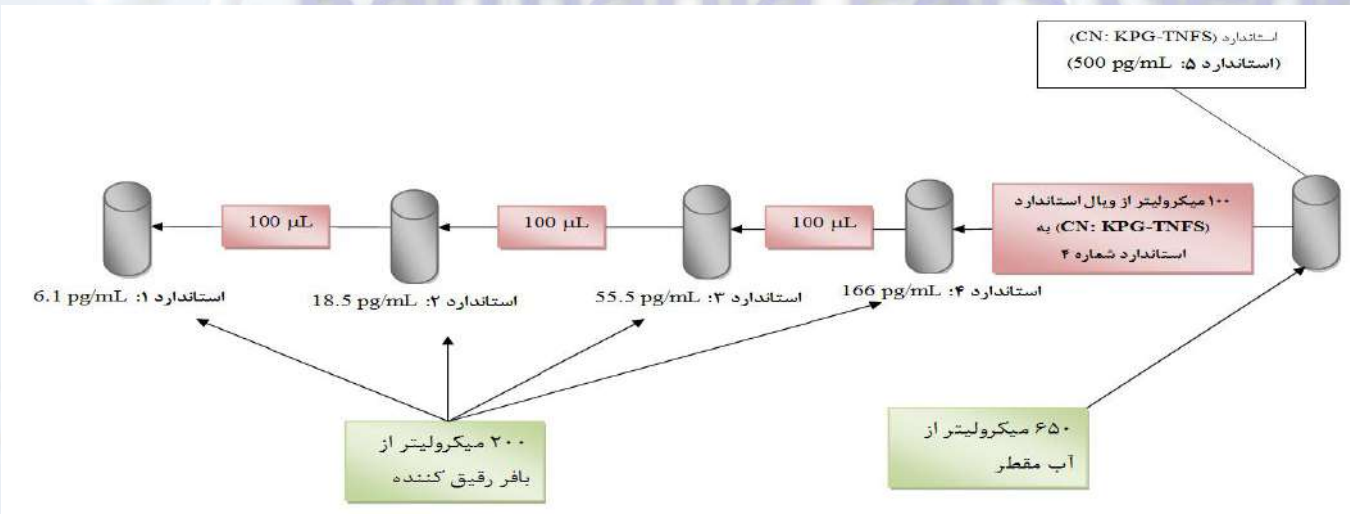
آنتی بادی های استفاده شده در این کیت قادر به شناسایی TNF-α در نمونه سرم/پلاسما، مایع مغزی-نخاعی و سوپرناتانت کشت سلولی می باشند.

توضیحی کوتاه درخصوص TNF-α:

TNF-α سایتوکینی التهابی است که عمدتا توسط سلول های ایمنی ذاتی مانند 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 نقش زیادی دارد. این سایتوکین عامل اصلی ایجاد بیماری شوک عفونی می باشد. 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 TNF-α 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 ۲۰۰ میکرولیتر از بافر رقیق کننده اضافه نمایید و این ویال ها را با نام استاندارد شماره ۱ تا ۴ نامگذاری نمایید.
- در ادامه به میزان ۶۵۰ میکرولیتر به ویال حاوی استاندارد (CN: KPG-HTNFS) آب مقطر اضافه نموده و سپس به مدت ۱۰ دقیقه در دمای محیط انکوبه کنید. محلول ایجاد شده دارای ۵۰۰ پیکوگرم بر میلی لیتر از سایتوکین TNF-α می باشد و استاندارد شماره ۵ کیت محسوب می شود.
- مطابق شکل زیر، به میزان ۱۰۰ میکرولیتر از ویال استاندارد شماره ۵ (CN: KPG-HTNFS) 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. در این حالت استاندارد شماره ۵ دارای غلظت ۵۰۰، استاندارد شماره ۴ دارای غلظت ۱۶۶، استاندارد شماره ۳ دارای غلظت ۵۵/۵، استاندارد شماره ۲ دارای غلظت ۱۸/۵، و استاندارد شماره ۱ دارای غلظت ۶/۱ پیکوگرم بر میلی لیتر می باشد.



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

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 Inter assay< %8, Intra assay< %3 می باشد.

نحوه کار با کیت برای اندازه گیری TNF-α

برای اندازه گیری TNF-α 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.

۲. به چاهک A1 به میزان ۶۰ میکرولیتر از استاندارد شماره ۵ (استاندارد (CN: KPG-HTNFS) با غلظت ۵۰۰ پیکوگرم بر میلی لیتر)، به چاهک B1 به میزان ۶۰ میکرولیتر از استاندارد شماره ۴ (۱۶۶پیکوگرم بر میلی لیتر)، به چاهک C1 به میزان ۶۰ میکرولیتر از استاندارد شماره ۳ (۵۵/۵ پیکوگرم بر میلی لیتر)، به چاهک D1 به میزان ۶۰ میکرولیتر از استاندارد شماره ۲ (۱۸/۵ پیکوگرم بر میلی لیتر)، به چاهک E1 به میزان ۶۰ میکرولیتر از استاندارد شماره ۱ (۶/۱ پیکوگرم بر میلی لیتر)، و به چاهک G1 به میزان ۶۰ میکرولیتر از استاندارد صفر (CN: KPG-HTNFSz) که در کیت به صورت آماده وجود دارد، اضافه کنید.

۳. به میزان ۶۰ میکرولیتر به باقی ویال ها نمونه مورد نظر را اضافه کنید.

۴. به مدت ۲ ساعت بر روی شیکر و در دمای اتاق و یا ترجیحا برای افزایش حساسیت کیت به مدت ۲۰ ساعت در دمای ۴ درجه سانتیگراد انکوبه کنید.

۵. 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.

۶. به میزان ۶۰ میکرولیتر از آنتی بادی کونژوگه به تمامی حفره ها اضافه کنید و به مدت ۱ ساعت در دمای اتاق و بر روی شیکر انکوبه کنید.

۷. 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.

۸. به میزان ۶۰ میکرولیتر از محلول HRP-Avidin به تمامی حفره ها اضافه کنید و به مدت نیم ساعت در دمای اتاق و بر روی شیکر انکوبه کنید.

۹. بعد از انکوباسیون مناسب، با استفاده از محلول شستشو پلیت ها را ۵ مرتبه شستشو دهید.

۱۰. به میزان ۶۰ میکرولیتر از سوبسترا به تمامی حفره ها اضافه کنید و به مدت ۱۵ دقیقه در دمای اتاق و بر روی شیکر انکوبه کنید.

۱۱. به میزان ۳۰ 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.

Karmania Pars Gene

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