بسمه تعالی

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

- **محتویات کیت:** ۱. پلیت کوت شده با آنتی بادی ضد TNF-α موشی (CN: KPG-MTNFP)، ۲. استانداردهای ۱ تا ۵ (CN: KPG-MTNFS1-5)، ۳. استاندارد صفر ($CN: KPG-MTNFS_{zero}$)، ۴. آنتی بادی کونژوگه (CN: KPG-MTNFD)، 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)

- **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 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 موشی طراحی و تولید شده است، بنابراین در اندازه گیری موارد مشابه حیوانی و انسانی کاربرد ندارد.

- **نحوه آماده سازی استاندارد:**

- در این کیت استاندارد به صورت آماده و در غلظتهای ۴۰۰ (استاندارد شماره ۵)، ۲۰۰ (استاندارد شماره ۴)، ۱۰۰ (استاندارد شماره ۳) ۵۰ (استاندارد شماره ۲)، ۲۵ (استاندارد شماره ۱) و ۰ (استاندارد شماره ۰) موجود می باشد و نیاز به آماده سازی ندارد.

- حساسیت کیت حاضر به میزان ۸ پیکوگرم بر میلی لیتر و دقت آن Inter assay< %10, Intra assay< %5 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 ویال A1 به میزان ۵۰ میکرولیتر از استاندارد شماره ۵ (CN: KPG-MTNFS5) با غلظت ۴۰۰ پیکوگرم بر میلی لیتر)، به ویال B1 به میزان ۵۰ میکرولیتر از استاندارد شماره ۴ (۲۰۰ پیکوگرم بر میلی لیتر)، به ویال C1 به میزان ۵۰ میکرولیتر از استاندارد شماره ۳ (۱۰۰ پیکوگرم بر میلی لیتر)، به ویال D1 به میزان ۵۰ میکرولیتر از استاندارد شماره ۲ (۵۰ پیکوگرم بر میلی لیتر)، به ویال E1 به میزان ۵۰ میکرولیتر از استاندارد شماره ۱ (۲۵ پیکوگرم بر میلی لیتر)، به ویال F1 به میزان ۵۰ میکرولیتر از استاندارد صفر ($CN: KPG-MTNFS_{zero}$) اضافه کنید.

۳. 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.

۴. 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.

۵. 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.

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

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** و بر روی شیکر (حداقل در دور RPM ۲۰۰) انکوبه کنید. دقت نمایید که در این مرحله نیاز به دمای ۳۷ درجه نیست.

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**

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 و بعد از شستشوها با پوشاندن پلیت ها از خشک شدن پلیت جلوگیری کنید.

KPG
Karmania Pars Gene