

### کیت تشخیصی میزان سایتوکین TNF- $\alpha$ رت (صرفاً برای بررسی در تحقیقات)

#### • محتویات کیت:

۱. پلیت کوت شده با آنتی بادی ضد TNF- $\alpha$  رت (CN: KPG-RTNFP)، ۲. استاندارد (CN: KPG-RTNFS)، ۳. استاندارد صفر (CN: KPG-RTNFSz)، ۴. آنتی بادی کونژوگه (CN: KPG-RTNFD)، 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:

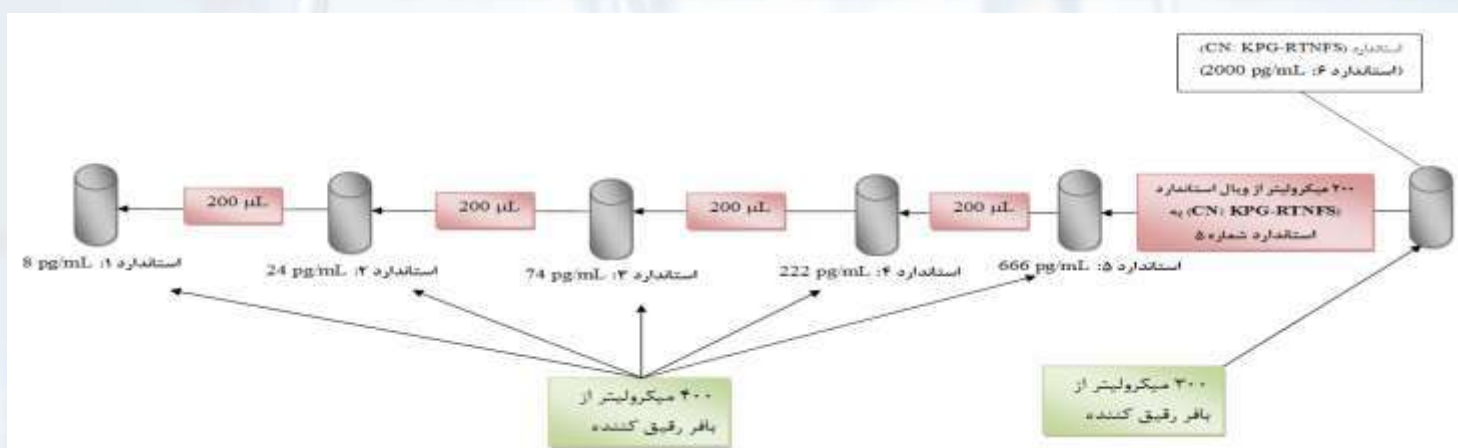
آنتی بادی های مورد استفاده شده در این کیت قادر به شناسایی TNF- $\alpha$  در نمونه سرم، پلاسما، مایع مغزی-نخاعی و سوپرناتانت کشت سلولی می باشند.

#### • توضیحی کوتاه در خصوص TNF- $\alpha$ :

TNF- $\alpha$  سایتوکینی التهابی است که عمدتاً 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- $\alpha$  رت طراحی و تولید شده است، بنابراین در اندازه گیری موارد مشابه حیوانی و انسانی کاربرد ندارد.

#### • نحوه آماده سازی استاندارد:

- ابتدا ۵ ویال ۵۰۰ میکرولیتری استریل آماده نموده و به ویال ها به میزان ۴۰۰ میکرولیتر از بافر رقیق کننده اضافه نمایید. این ویال ها را با نام استاندارد شماره ۱ تا ۵ نامگذاری کنید.
- در ادامه به میزان ۳۰۰ میکرولیتر به ویال حاوی استاندارد (CN: KPG-RTNFS) از بافر رقیق کننده اضافه نموده و سپس به مدت ۱۰ دقیقه در دمای محیط انکوبه کنید. محلول ایجاد شده دارای ۲۰۰۰ پیکوگرم بر میلی لیتر از سایتوکین TNF- $\alpha$  می باشد و استاندارد شماره ۶ کیت محسوب می شود.
- مطابق شکل زیر، به میزان ۲۰۰ میکرولیتر از ویال استاندارد (CN: KPG-RTNFS) به ویال شماره ۱ منتقل کرده و به شدت مخلوط کرده و به مدت ۳ دقیقه انکوبه کنید. این عمل را تا ویال شماره ۵ 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 ۸، ویال شماره ۴ دارای غلظت ۲۴، ویال شماره ۳ دارای غلظت ۷۴، ویال شماره ۲ دارای غلظت ۲۲۲، ویال شماره ۱ دارای غلظت ۶۶۶ و ویال اصلی استاندارد (CN: KPG-RTNFS) دارای غلظت ۲۰۰۰ پیکوگرم بر میلی لیتر می باشد.



دقت نمایید که بعد از محلول کردن استاندارد و خارج نمودن از حالت لیوفلیزه، بایستی در همان موقع استاندارد مورد استفاده قرار گیرد و قابل نگهداری نمی باشد. حساسیت کیت حاضر به میزان ۴ پیکوگرم بر میلی لیتر و دقت آن  $3\% < \text{Intra assay}$ ،  $9\% < \text{Inter assay}$  می باشد.

### نحوه کار با کیت برای اندازه گیری TNF- $\alpha$

• برای اندازه گیری TNF- $\alpha$  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 ۶ (استاندارد (CN: KPG-RTNFS) با غلظت ۲۰۰۰ پیکوگرم بر میلی لیتر)، به چاهک B1 به میزان ۶۰ میکرولیتر از استاندارد شماره ۵ (۶۶۶ پیکوگرم بر میلی لیتر)، به چاهک C1 به میزان ۶۰ میکرولیتر از استاندارد شماره ۴ (۲۲۲ پیکوگرم بر میلی لیتر)، به چاهک D1 به میزان ۶۰ میکرولیتر از استاندارد شماره ۳ (۷۴ پیکوگرم بر میلی لیتر)، به چاهک E1 به میزان ۶۰ میکرولیتر از استاندارد شماره ۲ (۲۴ پیکوگرم بر میلی لیتر)، به چاهک F1 به میزان ۶۰ میکرولیتر از استاندارد شماره ۱ (۸ پیکوگرم بر میلی لیتر) و به چاهک G1 به میزان ۶۰ میکرولیتر از استاندارد صفر (CN: KPG-RTNFSz) 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 ۳۷ درجه سانتیگراد و یا ترجیحا 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. دقت داشته باشید که محلول شستشو در غلظت 10X تهیه شده است. بنابراین قبل از شستشو، محلول شستشو را با آب مقطر دوبرابر تقطیر ۱۰ برابر رقیق نمایید. دقت داشته باشید که بعد از اضافه کردن محلول شستشو، پلیت ها را به مدت تقریبی ۱ دقیقه در دمای 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 در دمای 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 انکوبه و بر روی شیکر 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 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 های 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 توصیه 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.



<http://kpgene.ir>



09132926113



@karmaniaparsgene1



info@kpgene.ir



karmaniaparsgene