بسمه تعالی

کیت تشخیصی میزان سایتوکین IL-13 انسانی (صرفا برای بررسی در تحقیقات)

- **محتویات کیت:**

پلیت کوت شده با آنتی بادی ضد IL-13 انسانی (CN: KPG-HI13P)، ۲. استانداردهای ۱-۴ (CN: KPG-HI13S1-4)، ۳. آنتی بادی کونژوگه (CN: KPG-HI12D)، ۴. HRP-Avidin (CN: KPG-HA)، ۵. سوبسترا (CN: KPG-SU)، ۶. محلول متوقف کننده (CN: KPG-ST)، ۷. محلول شستشو 10X (CN: KPG-WB)، ۸. HRP Dilution (CN :KPG-DH)، ۹. HRP (CN : KPG-HAA)

.۱

- **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-13 در نمونه سرم، پلاسما، مایع مغزی-نخاعی و سوپرناتانت کشت سلولی می باشند.

- **توضیحی کوتاه درخصوص IL-13:**

IL-13 سایتوکینی التهابی است که عمدتا توسط سلول های ماکروفاژ و سلول های دندریتیک تولید می شود. این سایتوکین، مهمترین فاکتور فعال لنفوسیت های T می باشد از همین رو رابط مهم سیستم ایمنی ذاتی و اکتسابی 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 IL-13 انسانی طراحی و تولید شده است، بنابراین در اندازه گیری موارد مشابه حیوانی کاربرد ندارد.

- **استاندارد:**

- در این کیت استانداردها آماده کار و به صورت زیر می باشند:

استاندارد شماره ۴ دارای غلظت ۲۰۰، استاندارد شماره ۳ دارای غلظت ۱۰۰، استاندارد شماره ۲ دارای غلظت ۵۰ و استاندارد شماره ۱ دارای غلظت ۵ می باشد.

- حساسیت کیت حاضر به میزان ۱۰ پیکوگرم بر میلی لیتر و دقت آن Inter assay< %10, Intra assay< %3 می باشد.

نحوه آماده سازی محلول ها

- **محلول شستشو:** برای آماده سازی محلول شستشو (Washing Buffer) می بایست این محلول قبل از کار با استفاده از آب مقطر، ۱۰ برابر رقیق شود.
- **HRP-Avidin:** به میزان ۵۵ میکرولیتر از ویال HRP Dilution به ویال HRP-Avidin اضافه نموده و همچنین ویال HRP را با دستگاه میکروفیوژ اسپین کرده و تمام آن را به ویال HRP-Avidin اضافه کنید. برای عملکرد بهتر، میزان ۱۰۰ میکرولیتر از ویال HRP-Avidin به ویال HRP اضافه نمایید و بعد از چند بار سمپلینگ تمامی محتوای ویال را به ویال HRP-Avidin اضافه نمایید. دقت نمایید HRP رقیق شده بیش از یک هفته پایدار نیست. اگر تعداد نمونه های تهیه شده کمتر از ۹۶ عدد می باشد (به عنوان مثال ۴۸ نمونه) مقادیر را می توانید به همان نسبت مثلا با نسبت $\frac{1}{2}$ رقیق کنید.

درصورتی که مقادیر کمتر از کیت مورد استفاده قرار می گیرد، به ازای هر ردیف ۸ چاهکی، ۴۵۴ میکرولیتر از HRP-Avidin، ۱۱ میکرولیتر از HRP و ۴ **میکرولیتر از HRP Dilution را با یکدیگر مخلوط کنید.**

نمونه: در صورت استفاده از سرم، نمونه مستقیم بدون رقت سازی مورد استفاده قرار گیرد. در صورت استفاده از بافت، ۲۵ میلی گرم از بافت مورد نظر از نمونه ای که احتمال بیشترین میزان سایتوکین داده می شود را برداشته در ۵۰۰ میکرولیتر از بافر ریپا هموژن کرده و سپس تا ۸ بار رقت سازی به نسبت یک دوم انجام دهید. رقت مناسب بایستی دارای حداقل OD: 1/5 باشد.

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

- **نحوه کار با کیت برای اندازه گیری IL-13**

برای اندازه گیری IL-13 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 های A1 تا D1 به میزان ۵۰ میکرولیتر از استاندارد شماره ۴ تا ۱ اضافه کنید و به باقی چاهک ها به میزان ۵۰ میکرولیتر نمونه های مورد نظر را اضافه کنید و به مدت ۲ ساعت بر روی شیکر (۲۰۰ RPM) انکوبه کنید.

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 (Detection Ab) به تمامی چاهک ها اضافه کنید و به مدت ۱ ساعت بر روی شیکر (۲۰۰ RPM) 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 و بر روی شیکر (۲۰۰ RPM) انکوبه کنید.

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

۸. به میزان ۵۰ میکرولیتر از سوبسترا به تمامی حفره ها اضافه کنید و به مدت ۱۵ دقیقه بر روی شیکر (۲۰۰ RPM) 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 و عدم استفاده از شیکر 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.