بسمه تعالی

**کیت تشخیصی میزان کموکین CCL3 (MIP-1α) (صرفا برای بررسی در تحقیقات)**

- **محتویات کیت:**

۱. پلیت کوت شده با آنتی بادی ضد CCL3 انسانی (CN: KPG-HCL3P)، ۲. استاندارد (CN: KPG-HCL3S)، ۳. استاندارد صفر (CN: KPG-HCL3Sz)، ۴. آنتی بادی کونژوگه (CN: KPG-HCL3D)، 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:** 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 CCL3 در نمونه سرم، پلاسما، مایع مغزی-نخاعی و سوپرناتانت کشت سلولی می باشند.

➢ **توضیحی کوتاه درخصوص CCL3:**

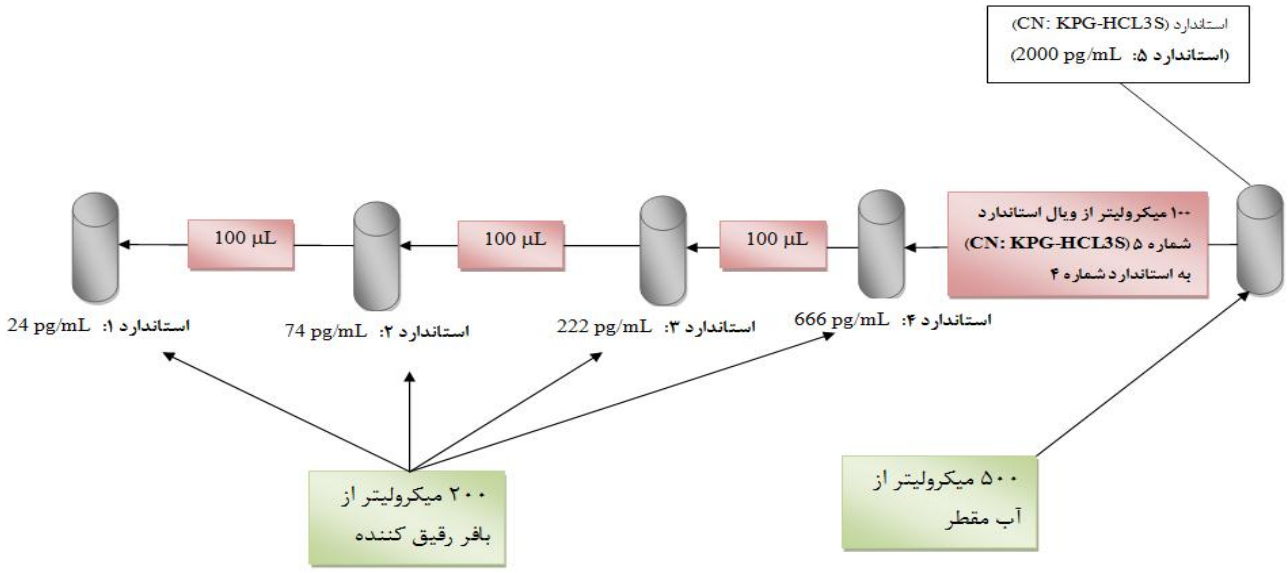
CCL3 که نام دیگر آن پروتئین ۱ آلفا التهابی ماکروفاژ (MIP-1α) است، کموکینی التهابی با وزن مولکولی تقریبی ۸ کیلودالتون می باشد. این کموکین با اتصال به گیرنده های CCR1 و CCR5 اقدام به ارتشاح لنفوسیت های خاطره ای، ماکروفاژها و سلول های دندریتیک می کند و توسط این سلول ها نیز تولید می شود. CCL3 نقش مهمی بر علیه ویروس ها مانند HSV-1 دارد و در پاتوژنز بیماری های التهابی مانند بیماری های خود ایمنی نیز نقش مهمی دارد. کیت حاضر با استفاده از آنتی بادی های مونوکلونال ضد CCL3 انسانی طراحی و تولید شده است، بنابراین در اندازه گیری موارد مشابه حیوانی کاربرد ندارد.

➢ **نحوه آماده سازی استاندارد:**

۱. ابتدا ۴ ویال ۵۰۰ میکرولیتری استریل آماده نموده و به ویال ها به میزان ۲۰۰ میکرولیتر از بافر رقیق کننده اضافه نمایید. در ادامه این ویال ها را با نام استاندارد شماره ۱ تا ۴ نامگذاری کنید.

۲. در ادامه به میزان ۵۰۰ میکرولیتر به ویال حاوی استاندارد (CN: KPG-CL3S) آب مقطر استریل دوبار تقطیر اضافه نموده و سپس به مدت ۱۰ دقیقه در دمای محیط انکوبه کنید. محلول ایجاد شده دارای ۲۰۰۰ پیکوگرم بر میلی لیتر از کموکین CCL3 می باشد و استاندارد شماره ۵ کیت محسوب می شود.

۳. مطابق شکل زیر، به میزان ۱۰۰ میکرولیتر از ویال استاندارد شماره ۵ (CN: KPG-HCL3S) به ویال 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. دقت داشته باشید که برای رسیدن به جواب بهینه، انکوباسیون ۳ دقیقه ای حتما رعایت شود. در این حالت استاندارد شماره ۴ دارای غلظت ۶۶۶، استاندارد شماره ۳ دارای غلظت ۲۲۲، استاندارد شماره ۲ دارای غلظت ۷۴ و استاندارد شماره ۱ دارای غلظت ۲۴ می باشد. دقت بفرمایید که استاندارد صفر (CN: KPG-HCL3Sz) از قبل در کیت فراهم شده است.




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 ۱۲ پیکوگرم بر میلی لیتر و دقت آن Inter assay< %9, Intra assay< %3 می باشد.

Pars Gene

## ➢ نحوه کار با کیت برای اندازه گیری CCL3

برای اندازه گیری CCL3 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 (۲۰۰۰ پیکوگرم بر لیتر)، به چاهک B1 به میزان ۶۰ میکرولیتر از استاندارد شماره ۴ (۶۶۶ پیکوگرم بر میلی لیتر)، به چاهک C1 به میزان ۶۰ میکرولیتر از استاندارد شماره ۳ (۲۲۲ پیکوگرم بر میلی لیتر)، به چاهک D1 به میزان ۶۰ میکرولیتر از استاندارد شماره ۲ (۷۴ پیکوگرم بر میلی لیتر)، به چاهک E1 به میزان ۶۰ میکرولیتر از استاندارد شماره ۱ (۲۴ پیکوگرم بر میلی لیتر) و به چاهک F1 ۶۰ میکرولیتر ازاستاندارد صفر (CN: KPG-HCL3Sz) که از قبل در کیت وجود دارد اضافه کنید.

۳. به میزان ۶۰ میکرولیتر به باقی ویال ها نمونه مورد نظر را اضافه کنید و به مدت ۲ ساعت بر روی شیکر انکوبه کنید.

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 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.

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 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.

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

۱۰. 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 استانداراد 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. کموکین 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.

**با ما تماس بگیرید:**

سایت: http://kpgene.ir کانال تلگرامی: @karmaniaparsgene1 تلفن: ۰۹۱۳۲۹۲۶۱۱۳

Karmania Pars Gene