

بسمه تعالی

کیت تشخیصی میزان سایتوکین IL-6 موشی (صرفاً برای بررسی در تحقیقات)

➤ محتویات کیت:

۱. پلیت کوت شده با آنتی بادی ضد IL-6 موشی (CN: KPG-MI6P)، ۲. استاندارد های شماره ۴-۱ (CN: KPG-MI6S4-1)، ۳. آنتی بادی کونژوگه (CN: KPG-MI6D)، 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)

➤ 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-6 در نمونه سرم، پلاسما، مایع مغزی-نخاعی و سوپرناتانت کشت سلولی می باشند.

➤ توضیحی کوتاه در خصوص IL-6:

IL-6 سایتوکینی التهابی است که عمدتاً توسط 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 نیز نقش زیادی دارد. 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-6 موشی طراحی و تولید شده است، بنابراین در اندازه گیری موارد مشابه حیوانی کاربرد ندارد.

➤ نحوه آماده سازی استاندارد:

➤ استاندارد های موجود در کیت آماده و از شماره ۱ تا ۴ می باشند. استاندارد شماره ۴ دارای غلظت ۲۰۰ پیکوگرم بر میلی لیتر، استاندارد شماره ۳ دارای غلظت ۱۰۰ پیکوگرم بر میلی لیتر، استاندارد شماره ۲ دارای غلظت ۵۰ پیکوگرم بر میلی لیتر و استاندارد شماره ۱ دارای غلظت ۰ پیکوگرم بر میلی لیتر از IL-6 موشی می باشد.

حساسیت کیت حاضر به میزان ۲ پیکوگرم بر میلی لیتر و دقت آن $\text{Intra assay} < 3\%$ ، $\text{Inter assay} < 8\%$ 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 ۳۳۰ میکرولیتر از ویال HRP Dilution به ویال HRP-Avidin اضافه نموده و همچنین ۲۲ میکرولیتر از ویال HRP را به ویال HRP-Avidin اضافه کنید. دقت نمایید قبل از استفاده از ویال HRP حتماً ابتدا اسپین شود. 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 ردیف ۳ را می توانید به همان نسبت مثلاً با نسبت یک دوم رقیق کنید.

نحوه کار با کیت برای اندازه گیری IL-6

برای اندازه گیری IL-6 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 تا D1 به میزان ۵۰ میکرولیتر از استاندارد های شماره ۴ تا ۱ اضافه کنید و سپس به میزان ۵۰ میکرولیتر به باقی ویال ها نمونه مورد نظر را اضافه کنید و به مدت ۱ 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 در دمای اتاق انکوبه کنید و سپس تخلیه نمایید.
۴. به میزان ۵۰ میکرولیتر از آنتی بادی کونژوگه به تمامی حفره ها اضافه کنید و به مدت ۱ ساعت در دمای اتاق و بر روی شیکر (۲۰۰ RPM) انکوبه کنید.



<http://kpgene.ir>



@karmaniaparsgene1



karmaniaparsgene



09132926113



info@kpgene.ir

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 در دمای اتاق انکوبه کنید و سپس تخلیه نمایید.
۶. به میزان ۵۰ میکرولیتر از محلول HRP-Avidin رقیق شده به تمامی حفره ها اضافه کنید و به مدت نیم ساعت در دمای اتاق 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 سوپسترا به تمامی حفره ها اضافه کنید و به مدت ۱۵ دقیقه در دمای اتاق و بر روی شیکر انکوبه (۲۰۰ RPM) 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 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 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 سمپلهای 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 تعویبه 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.



KPG
Karmania Pars Gene