بسمه تعالی

کیت تشخیصی میزان سایتوکین IL-6 رت (صرفا برای بررسی در تحقیقات)

- **محتویات کیت:**

۱. پلیت کوت شده با آنتی بادی ضد IL-6 رت (CN: KPG-RI6P)، ۲. استانداردهای ۱-۴ (CN: KPG-RI6S1-4)، ۳. آنتی بادی کونژوگه (CN: KPG-RI6D)، 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 رت می باشند.

- **توضیحی کوتاه درخصوص IL-6:**

IL-6 سایتوکینی التهابی است که عمدتا 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 رت طراحی و تولید شده است، بنابراین در اندازه گیری موارد مشابه حیوانی کاربرد ندارد.

- **نحوه آماده سازی استاندارد:**

استاندارد های موجود در این کیت آماده مصرف و به غلظت های ۲۰۰ پیکوگرم بر میلی لیتر برای استاندارد شماره ۴، ۱۰۰ پیکوگرم بر میلی لیتر برای استاندارد شماره ۳، ۵۰ پیکوگرم بر میلی لیتر برای استاندارد شماره ۲ و ۵ پیکوگرم بر میلی لیتر برای استاندارد شماره ۱ می باشند.

حساسیت کیت حاضر به میزان ۲ پیکوگرم بر میلی لیتر و دقت آن Inter assay< %8, 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 ۳۳۰ میکرولیتر از ویال HRP Dilution به ویال HRP-Avidin اضافه نموده و همچنین تمامی محتوای ویال HRP 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، ۴۳۰ میکرولیتر از HRP-Avidin، ۳ میکرولیتر از HRP و ۲۷ **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-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 چاهک A1 تا D1 به ترتیب به میزان ۵۰ میکرولیتر از استاندارد های شماره ۴ تا ۱ اضافه کنید و به باقی چاهک ها به میزان ۵۰ میکرولیتر نمونه مورد نظر را اضافه کنید و برای جلوگیری از تبخیر سطح پلیت ها را بپوشانید و در ادامه 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 دردمای اتاق انکوبه کنید و سپس تخلیه نمایید.

۴. به میزان ۵۰ میکرولیتر از آنتی بادی کونژوگه (Detection Ab) به تمامی حفره ها اضافه کنید و برای جلوگیری از تبخیر سطح پلیت ها را بپوشانید و در ادامه 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 برای جلوگیری از تبخیر سطح پلیت ها را بپوشانید و در ادامه به مدت نیم ساعت 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 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

خطاها به چند دلیل ممکن است ایجاد شوند. 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 ۲ 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. در برخی مواقع میزان OD استاندارد صفر ممکن است بیش از عدد ۰/۰۹ باشد. دلیل احتمالی این امر عدم شستشوی مناسب باشد. برای رفع این مشکل می توان پایین ترین OD مربوط به نمونه ها را به عنوان صفر برای دستگاه تعریف کرد تا تمامی نمونه ها در رنج قابل اندازه گیری قرار بگیرند.

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