بسمه تعالی

کیت تشخیصی میزان سایتوکین IFN-γ انسانی (صرفا برای بررسی در تحقیقات)

- **محتویات کیت:**

۱. پلیت کوت شده با آنتی بادی ضد **IFN-γ** انسانی (CN: KPG-HIFNP)، ۲. استاندارد (CN: KPG-HIFNS)، ۳. آنتی بادی کونژوگه (CN: KPG-HIFND)، ۴. سوبسترا (CN: KPG-SU)، ۵. محلول متوقف کننده (CN: KPG-ST)، ۶. محلول شستشو 20X (CN: KPG-WB)، **۷**. بافر رقیق کننده (Elution buffer)

- **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 **IFN-γ** در نمونه سرم، پلاسما، مایع مغزی-نخاعی و سوپرناتانت کشت سلولی می باشند.
- **توضیحی کوتاه درخصوص IFN-γ:**

IFN-γ سایتوکینی التهابی است که عمدتا توسط لنفوسیت های T کمکی و سلول های کشنده طبیعی 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. 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 **IFN-γ** انسانی طراحی و تولید شده است، بنابراین در اندازه گیری موارد مشابه حیوانی کاربرد ندارد.

- **نحوه آماده سازی محلول ها:**

نحوه آماده سازی محلول شستشو: برای آماده سازی محلول شستشو (Washing Buffer) می بایست این محلول قبل از کار با استفاده از آب مقطر، ۲۰ برابر رقیق شود. دقت نمایید محلول رقیق شده فقط یک هفته پایدار است. بنابراین به میزان نیاز رقیق شود.

نحوه آماده سازی آنتی بادی کونژوگه (Detection Ab): آنتی بادی کونژوگه بایستی قبل از شروع کار با آب مقطر دیونیزه مخلوط شود تا از حالت لیوفلیزه خارج شود. به این منظور ۳۰۰ میکرولیتر از آب مقطر دیونیزه به ویال آنتی بادی کونژوگه (CN: KPG-HIFND) اضافه شود و به آرامی مخلوط شود تا آنتی بادی 100X آماده شود. در ادامه برای استفاده از این آنتی بادی بایستی با بافر رقیق کننده (Elution buffer) ۱۰۰ برابر رقیق و آماده به کار شود. از آنجایی که آنتی بادی کونژوگه بعد از رقیق شدن پایدار نیست و بایستی همان روز مصرف شود، بنابراین به میزان مورد نیاز از آنتی بادی رقیق بفرمایید و باقیمانده آنتی بادی را به دمای یخچال (۲-۸ درجه سانتیگراد) منتقل کنید. جدول زیر میزان مورد استفاده از آنتی بادی برای ردیف های ۸ تایی الایزا می باشد.

تعداد ردیف ۸ عددی (استریپ)	میزان آنتی بادی کونژوگه X	میزان بافر رقیق کننده
۲	۱۰ میکرولیتر	۱۰۰۰ میکرولیتر
۳	۱۵ میکرولیتر	۱۵۰۰ میکرولیتر
۴	۲۰ میکرولیتر	۲۰۰۰ میکرولیتر
۵	۲۵ میکرولیتر	۲۵۰۰ میکرولیتر
۶	۳۰ میکرولیتر	۳۰۰۰ میکرولیتر
۷	۳۵ میکرولیتر	۳۵۰۰ میکرولیتر
۸	۴۰ میکرولیتر	۴۰۰۰ میکرولیتر
۹	۴۵ میکرولیتر	۴۵۰۰ میکرولیتر
۱۰	۵۰ میکرولیتر	۵۰۰۰ میکرولیتر
۱۱	۵۵ میکرولیتر	۵۵۰۰ میکرولیتر
۱۲	۶۰ میکرولیتر	۶۰۰۰ میکرولیتر

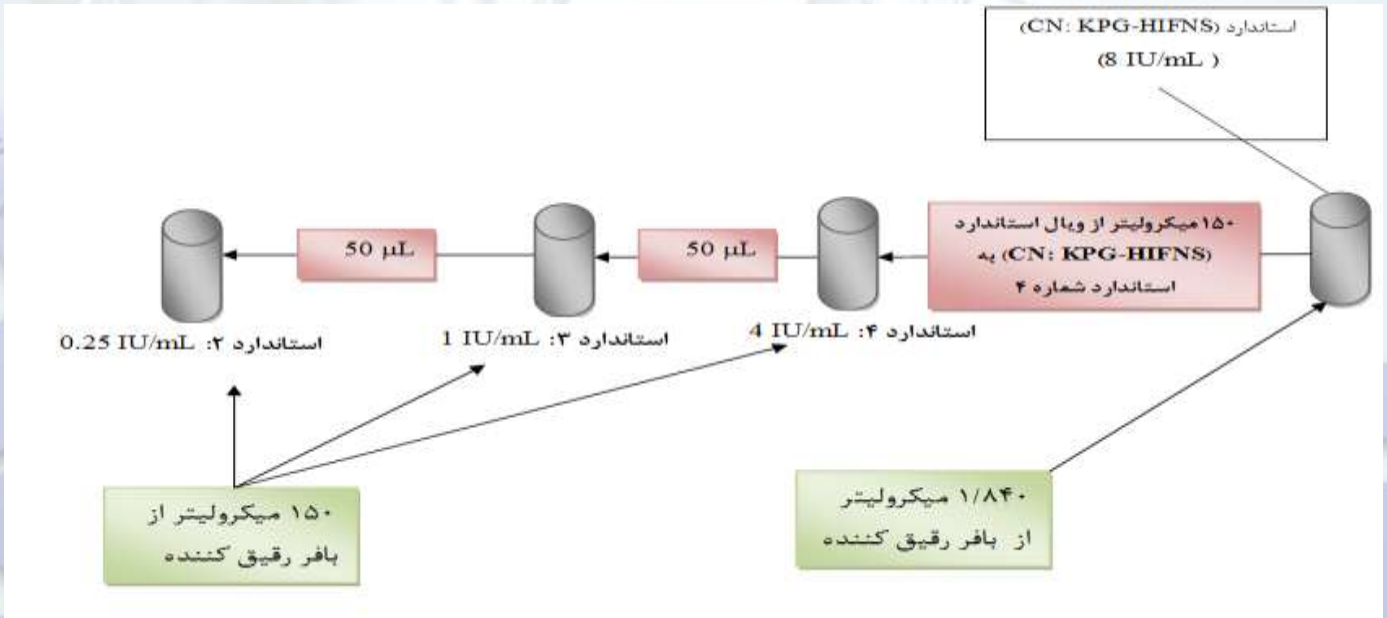
Karmania Pars Gene
http://kpgene.ir
09132926113
@karmaniaparsgene1
info@kpgene.ir
karmaniaparsgene

نحوه آماده سازی استاندارد:

- ابتدا ۴ ویال ۵۰۰ میکرولیتری استریل آماده نموده و به ویال ها به میزان ۱۵۰ میکرولیتر از بافر رقیق کننده (Elution buffer) اضافه نمایید. در ادامه این ویال ها را با نام استاندارد شماره ۱ تا ۴ نامگذاری کنید.

- در ادامه به میزان ۱/۸۴۰ میکرولیتر به ویال حاوی استاندارد (CN: KPG-IFNS) از آب مقطر اضافه نموده و به آرامی مخلوط نمایید. سپس به مدت ۱۰ دقیقه در دمای محیط انکوبه کنید. محلول ایجاد شده دارای IU/mL ۸ از سایتوکین IFN-γ می باشد.

- مطابق شکل زیر، به میزان ۱۵۰ میکرولیتر از ویال استاندارد (CN: KPG-HIFNS) به ویال استاندارد شماره ۴ منتقل کرده و مخلوط کنید. در این حالت استاندارد شماره ۴ دارای IU/mL ۴ از سایتوکین IFN-γ می باشد. به میزان ۵۰ میکرولیتر از ویال استاندارد شماره ۴ به ویال استاندارد شماره ۳ منتقل کرده و مخلوط کنید. در این حالت استاندارد شماره ۳ دارای IU/mL ۱ از سایتوکین IFN-γ می باشد. به میزان ۵۰ میکرولیتر از ویال استاندارد شماره ۳ به ویال استاندارد شماره ۲ منتقل کرده و مخلوط کنید. در این حالت استاندارد شماره ۲ دارای IU/mL ۰/۲۵ از سایتوکین IFN-γ می باشد. ویال استاندارد شماره ۱ به عنوان استاندراد با میزان صفر درنظر گرفته شود.



دقت داشته باشید در این کیت به طور معمول استاندارد شماره ۴ دارای OD بالاتر از ۰/۶ و استاندارد شماره ۱ دارای OD کمتر از ۰/۱۵ می باشند.

حساسیت کیت حاضر به میزان ۴ پیکوگرم بر میلی لیتر و دقت آن Inter assay< %9, Intra assay< %3 می باشد.

Karmania Pars Gene

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

- **نحوه کار با کیت برای اندازه گیری IFN-γ**

برای اندازه گیری **IFN-γ** 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 تاD1 به میزان ۵۰ میکرولیتر از استاندارد شماره ۴ تا ۱ را اضافه کنید و در ادامه به میزان ۵۰ میکرولیتر به باقی چاهک ها نمونه مورد نظر را اضافه کنید و در ادامه به میزان ۵۰ میکرولیتر از آنتی بادی کونژوگه تازه رقیق شده به تمامی چاهک ها اضافه کنید و بعد از پوشاندن سطح چاهک ها، به مدت ۱ دقیقه بر روی شیکر (حداقل در دور RPM ۲۰۰) انکوبه کنید. در ادامه پلیت ها را به مدت دو ساعت در دمای اتاق (۲۲-۲۷ درجه سانتیگراد) و دور از نور مستقیم خورشید انکوبه کنید

۳. 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 به میزان ۴۰۰ میکرولیتر، پلیت ها را به مدت تقریبی ۱ دقیقه دردمای اتاق انکوبه کنید و سپس تخلیه نمایید و با واژگون کردن بر روی دستمال کاغذی آبگیری نمایید.

۴. به میزان ۱۰۰ میکرولیتر از سوبسترا به تمامی چاهک ها اضافه کنید و بعد از ۱ دقیقه انکوباسیون بر روی شیکر (حداقل در دور RPM ۲۰۰)، پلیت را به مدت ۳۰ دقیقه دردمای اتاق (۲۲-۲۷ درجه سانتیگراد) و دور از نور انکوبه کنید.

۵. به میزان ۵۰ میکرولیتر از محلول متوقف کننده به تمامی چاهک ها اضافه کنید و خوب مخلوط نمایید. میزان جذب نمونه ها در دستگاه الیزا ریدر در طول موج ۴۵۰ نانومتر (و ۶۳۰ نانومتر به عنوان رفرنس) مورد اندازه گیری قرار گیرد. پلیت ها در این مرحله باید در کمتر از ۵ دقیقه خوانش شوند.

- **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 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. عدم استفاده از شیکر به شدت بر میزان حساسیت کیت تاثیر گذار است. دقت نمایید در طول انکوباسیون ها با پوشاندن پلیت ها از خشک شدن نمونه ها جلوگیری کنید. در طول کار به ویژه بعد از شستشو از خشک شدن پلیت به طور جدی اجتناب کنید و تمام مراحل پشت سر هم و بدون وقفه انجام شود زیرا خشک شدن پلیت ها به شدت بر کیفیت کیت اثر گذار می باشد.

Karmania Pars Gene