بسمه تعالی

کیت تشخیصی میزان سایتوکین TGF-β موشی/انسانی(صرفا برای بررسی در تحقیقات)

محتویات کیت: ۱. پلیت کوت شده با آنتی بادی ضد TGF-β انسانی (CN: KPG-MTGFP)، ۲. استانداردهای ۴ تا ۱ (CN: KPG-MTGFS)، ۳. آنتی بادی کونژوگه (CN: KPG-MTGFD)، 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. HCL 1N و ۹. NaOH 1N . HRP Dilution 10 (CN :KPG-DH)-. ۱۱. 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 TGF-β در نمونه سرم، پلاسما، مایع مغزی-نخاعی و سوپرناتانت کشت سلولی موش و انسان می باشند.

- **توضیحی کوتاه درخصوص TGF-β:**

TGF-β سایتوکینی ضد التهابی است که توسط تعداد زیادی از سلول های ایمنی از جمله لنفوسیت های T تنظیم کننده و ماکروفاژها تولید می شود. این سایتوکین، دارای خواص ضد التهابی فراوانی است و بر روی تعداد یادی از سلول های ایمنی دارای گیرنده می باشد. با وجود خواص ضد التهابی، این سایتوکین در رشد و بلوغ لنفوسیت های Th17 نقش مهمی ایفا می کند. بنابراین این سایتکین به همراه سایتوکین های IL-2 و IL-6 می تواند نقش التهابی نیز ایفا کند. TGF-β دارای نقش مهمی در ایجاد هوئوستاز به دنبال عفونتهای میکروبی و همچنین جلوگیری از ایجاد بیماری های خود ایمنی می باشد. بنابراین این سایتوکین به عنوان یک شاخص عمدتا ضد 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 TGF-β موشی و انسانی طراحی و تولید شده است، بنابراین در اندازه گیری موارد مشابه حیوانی کاربرد ندارد.

- **نحوه آماده سازی استاندارد:**

- استاندارد های موجود در کیت به صورت آماده می باشند و در غلظت های ۲۰۰ (CN: KPG-MTGFS4)، ۱۰۰ (CN: KPG-MTGFS3)، ۵۰ (CN: KPG-MTGFS2) و ۵ (CN: KPG-MTGFS1) پیکوگرم بر میلی لیتر از TGF-β می باشند.

حساسیت کیت حاضر به میزان ۶ پیکوگرم بر میلی لیتر و دقت آن Inter assay< %9, Intra assay< %3 می باشد.

- **نحوه آماده سازی نمونه:**

TGF-β موجود در نمونه سرم/پلاسما و بافت انسان یا موش بایستی ابتدا با اسید فعال شده سپس توسط این کیت مورد اندازه گیری قرار بگیرد. دقت نمایید استاندارد نیاز به فعال سازی ندارد. به این منظور برای فعال سازی TGF-β نمونه بافت یا سرم طبق پروتوکول زیر عمل کنید:

- فعال سازی TGF-β بافت: ابتدا نمونه بافت را کامل هموژنیزه کرده در ادامه به میزان ۵۰ میکرولیتر از سوپرناتانت نمونه را با ۱۰ میکرولیتر از اسید HCL یک نرمال (1N HCL) به مدت ۱۰ دقیقه در دمای محیط انکوبه کنید و در ادامه با ۱۰ میکرولیتر از NaOH یک نرمال (1N NaOH) خنثی کنید. در این حالت نمونه آماده بررسی با کیت حاضر می باشد. دقت نمایید در انتها غلظت به دست آمده برای هر نمونه در عدد ۱/۴ ضرب شود تا غلظت نهایی نمونه محاسبه شود.

- فعال سازی TGF-β سرم یا پلاسما: ۵۰ میکرولیتر از نمونه سرم یا پلاسما را با ۱۰ میکرولیتر از اسید HCL یک نرمال (1N HCL) به مدت ۱۰ دقیقه در دمای محیط انکوبه کنید و در ادامه با ۱۰ میکرولیتر از NaOH یک نرمال (1N NaOH) خنثی کنید. در این حالت نمونه آماده بررسی با کیت حاضر می باشد.

. دقت نمایید در انتها غلظت به دست آمده برای هر نمونه در عدد ۱/۴ ضرب شود تا غلظت نهایی نمونه محاسبه شود. دقت کنید که این مراحل برای آماده سازی استاندارد مورد نیاز نیست و فقط بر روی نمونه بایستی انجام شود.

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

درصورتی که مقادیر کمتر از کیت مورد استفاده قرار می گیرد، به ازای هر ردیف ۸ چاهکی، ۴۴۰ میکرولیتر از HRP-Avidin، ۴ میکرولیتر از HRP و ۱۸ **میکرولیتر از HRP Dilution را با یکدیگر مخلوط کنید.**

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.

- **نحوه کار با کیت برای اندازه گیری TGF-β**

۱. پلیت را از بسته مورد نظر خارج کرده و در محیطی خشک به دمای اتاق برسانید.

۲. به چاهک A1 به میزان ۵۰ میکرولیتر از استاندارد شماره ۴ (۲۰۰ پیکوگرم بر میلی لیتر)، به چاهک B1 به میزان ۵۰ میکرولیتر از استاندارد شماره ۳ (۱۰۰ پیکوگرم بر میلی لیتر)، به چاهک C به میزان ۵۰ میکرولیتر از استاندارد شماره ۲ (۵۰ پیکوگرم بر میلی لیتر) و به چاهک D به میزان ۵۰ میکرولیتر از استاندارد شماره ۱ (۵ پیکوگرم بر میلی لیتر) اضافه کنید.

۳. به باقی ویال ها به میزان ۵۰ میکرولیتر نمونه مورد نظر را اضافه و به مدت ۱ ساعت بر روی شیکر (دور 180 RPM) 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. بعد از تخلیه محلول شستشو، در صورت استفاده از روش دستی، پلیت ها را با ضربه زدن بر روی دستمال کاغذی به خوبی تخلیه نمایید.

۵. به میزان ۵۰ میکرولیتر از آنتی بادی کونژوگه به تمامی حفره ها اضافه کنید و به مدت ۱ ساعت بر روی شیکر (دور 180 RPM) انکوبه کنید.

۶. بعد از انکوباسیون مناسب، با استفاده از محلول شستشو پلیت ها را ۳ مرتبه شستشو دهید. بعد از تخلیه محلول شستشو، در صورت استفاده از روش دستی، پلیت ها را با ضربه زدن بر روی دستمال کاغذی به خوبی تخلیه نمایید.

۷. به میزان ۵۰ میکرولیتر از محلول HRP-Avidin به تمامی حفره ها اضافه کنید و به مدت نیم ساعت بر روی شیکر (دور 180 RPM) 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. بعد از تخلیه محلول شستشو، در صورت استفاده از روش دستی، پلیت ها را با ضربه زدن بر روی دستمال کاغذی به خوبی تخلیه نمایید.

۹. به میزان ۵۰ میکرولیتر از سوبسترا به تمامی حفره ها اضافه کنید و به مدت ۱۵ دقیقه در دمای اتاق و بر روی شیکر انکوبه کنید. دقت نمایید که زمان ۱۵ دقیقه برای انکوباسیون کافی است اما درصورتی که میزان رنگ تولیدی کم باشد، زمان را تا ۲۰ دقیقه می توان افزایش داد.

۱۰. 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.

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

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 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 بهتر است بعد از اضافه کردن محلول شستشو، پلیت را به مدت ۱ دقیقه بر روی شیکر قرار دهید سپس تخلیه نمایید. همچنین 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.

KPG
Karmania Pars Gene