بسمه تعالی

کیت تشخیصی میزان VEGF انسانی (صرفا برای بررسی در تحقیقات)

- **محتویات کیت:**

۱. پلیت کوت شده با آنتی بادی ضد VEGF انسانی (CN: KPG-HVEGFP)

۲. استاندارد های شماره ۱-۲ (CN: KPG-HVEGFS1-2)

۳. آنتی بادی کونژوگه (CN: KPG-HVEGFD)

٤. HRP-Avidin (CN: KPG-HA)

٥. سوبسترا (CN: KPG-SU)

٦. محلول متوقف کننده (CN: KPG-ST)

۷. محلول شستشو 10X (CN: KPG-WB)

۸. Dilution HRP (CN :KPG-DH)

۹. HRP Anzyme (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 VEGF در نمونه سرم، پلاسما، مایع مغزی-نخاعی و سوپرناتانت کشت سلولی انسان می باشند.

- **توضیحی کوتاه درخصوص** TNF-α:

Vascular endothelial growth factor (VEGF) یک مولکول سیگنالینگ است که موجب تحریک رگ سازی می شود و جزء خانواده مولکول های رشد می باشد. این مولکول عمدتا در شرایط هیپوکسی (کمبود اکسیژن) تولید می شود. سطح سرمی این مولکول در بیماری های مرتبط با هیپوکسی مانند آسم برونشیال و دیابت به میزان زیادی افزایش پیدا می کند. افزایش بیش از حد این مولکول منجر به برخی اختلالات مانند Retina می شود. بنابراین این مولکول به عنوان یک شاخص در ایجاد رگ زایی کاربرد فراوانی در مطالعات آزمایشگاهی برای بررسی وضعیت یک بیماری و یا اثرات یک دارو دارا می باشد. کیت حاضر با استفاده از آنتی بادی های مونوکلونال ضد VEGF انسان طراحی و تولید شده است، بنابراین در اندازه گیری موارد مشابه حیوانی و انسانی کاربرد ندارد.

- **نحوه آماده سازی استاندارد:**

➢ استاندارد های این کیت به صورت آماده کار و به صورت استاندارد شماره ۲ (۲۰۰ پیکوگرم بر میلی لیتر)، استاندارد شماره ۱ (۱۰۰ پیکوگرم بر میلی لیتر) می باشد.

حساسیت کیت حاضر به میزان ۱۰ پیکوگرم بر میلی لیتر و دقت آن Inter assay< %9, Intra assay< %3 می باشد.

نحوه کار با کیت برای اندازه گیری VEGF

- برای اندازه گیری VEGF 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. در ادامه به چاهک A1 تا B1 از استانداردهای ۱ تا ۲ اضافه نمایید.

۲. به میزان ۵۰ میکرولیتر به باقی ویال ها نمونه مورد نظر را اضافه کنید و به مدت ۱ ساعت در دمای محیط بر روی شیکر (در دور ۲۰۰ RPM) انکوبه کنید.

۳. به میزان ۲۵۰ میکرولیتر از ویال Dilution HRP به ویال HRP-Avidin اضافه نموده و همچنین میزان ۲۲ میکرولیتر از ویال HRP Enzyme به ویال HRP-Avidin اضافه کنید (اگر تعداد نمونه های تهیه شده کمتر از ۹٦ عدد می باشد(به عنوان مثال ٤۸ نمونه) مقادیر ردیف ۳ را می توانید به نسبت $\frac{1}{2}$ رقیق کنید.

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

٤. 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 ۵۰ میکرولیتر از آنتی بادی کونژوگه به تمامی حفره ها اضافه کنید و به مدت ۱ ساعت در دمای محیط و بر روی شیکر (در دور RPM ۲۰۰) انکوبه کنید.

٦. 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 ۵۰ میکرولیتر از محلول HRP-Avidin به تمامی حفره ها اضافه کنید و به مدت نیم ساعت در دمای محیط بر روی شیکر (در دور RPM ۲۰۰) 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 ۵۰ میکرولیتر از سوبسترا به تمامی حفره ها اضافه کنید و به مدت ۱۵ دقیقه در دمای محیط و بر روی شیکر (در دور RPM ۲۰۰) انکوبه کنید.

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 ٤٥٠ 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 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، شرایط بد برای نگهداری استانداردها (دمای بیش از ۲۰- درجه سانتیگراد) می باشد. سایتوکین ها مولکول هایی ناپایدار می باشند و برای اندازه گیری آن ها بایستی استاندارد در دمای ۲۰- نگهداری 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.

Karmania Pars Gene

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