بسمه تعالی

کیت تشخیصی میزان سایتوکین IgE موشی (صرفا برای بررسی در تحقیقات)

محتویات کیت: ۱. پلیت کوت شده با آنتی بادی ضد **IgE** موشی (CN: KPG-MIGEP)، ۲. استاندارد (CN: KPG-MIGES)، ۳. استاندارد صفر (CN: KPG-$MIGES_{zero}$)، ۴. آنتی بادی کونژوگه (CN: KPG-MIGED)، ۵. HRP-Avidin (CN: KPG-HA)، ۶. سوبسترا (CN: KPG-SU)، ۷. محلول متوقف کننده (CN: KPG-ST)، ۸. محلول شستشو 10X (CN: KPG-WB)، ۹. بافر رقیق کننده (CN: KPG-EB)

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 این کیت قادر به شناسایی **IgE** در نمونه سرم، پلاسما، مایع مغزی-نخاعی و سوپرناتانت کشت سلولی موشی می باشند.

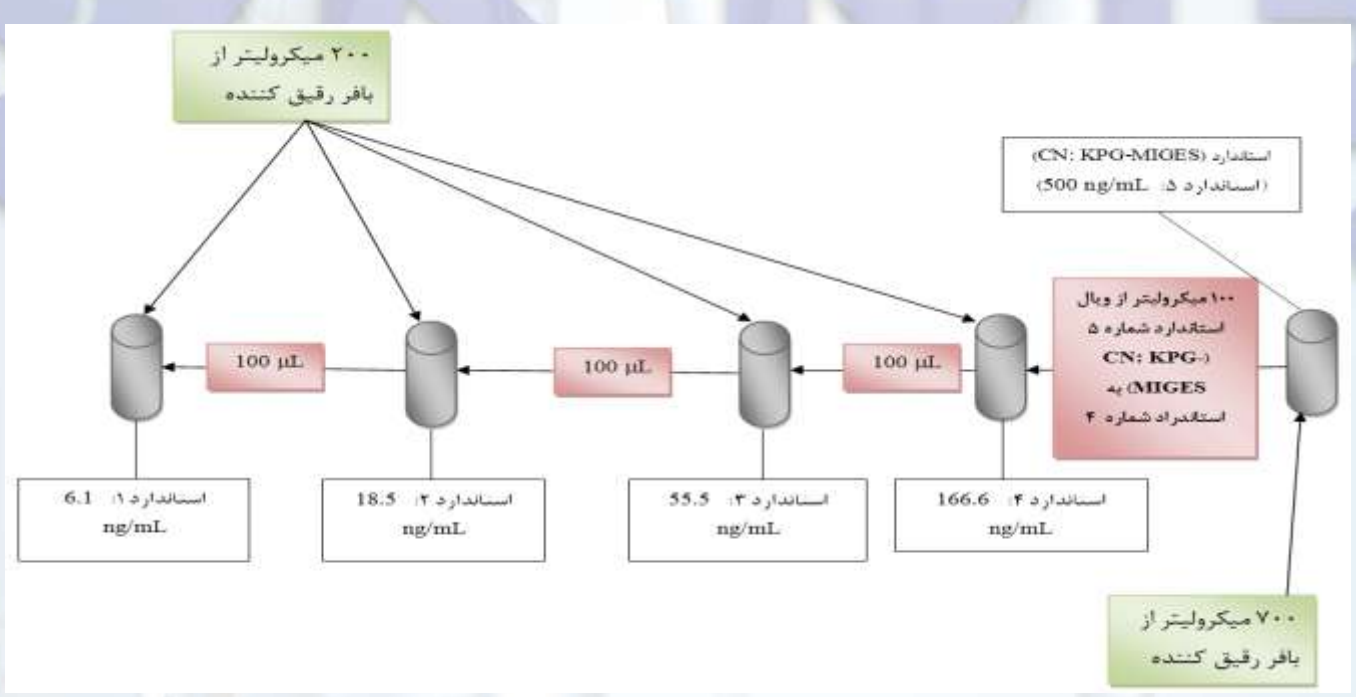
توضیحی کوتاه درخصوص IgE: IgE نوعی آنتی بادی می باشد که زنجیره سنگین آن از کلاس اپسیلون است. این آنتی بادی مهمترین عامل سیستم ایمنی هومورال بر علیه انگل ها به شمار می آید. از طرفی نقش مهم این آنتی بادی در ایجاد آلرژی به خوبی شناخته شده است. به گونه ای که سلول هایی همچون ماست سل ها، ائوزینوفیل ها و بازوفیل ها با داشتن گیرنده نوع ۱ IgE (FCεRI) قادر به شناسایی فرم های آزاد IgE می باشند و به فرم حساس تبدیل می شوند و در ورود مجدد آلرژن اقدام به ترشح واسطه های خود و ایجاد علائم آلرژی می کنند. بنابراین بررسی میزان سرمی و یا بافتی IgE از اهمیت ویژه ای در بیماری های انگلی و آلرژی برخوردار است. کیت حاضر با استفاده از آنتی بادی های مونوکلونال ضد IgE موشی طراحی و تولید شده است، بنابراین در اندازه گیری موارد مشابه حیوانی و انسانی کاربرد ندارد.

نحوه آماده سازی استاندارد:

- ابتدا ۴ ویال ۵۰۰ میکرولیتری استریل آماده نموده و به ویال ها به میزان ۲۰۰ میکرولیتر از بافر رقیق کننده اضافه نمایید. در ادامه این ویال ها را با نام استاندارد شماره ۱ تا ۴ نامگذاری کنید.

- در ادامه به میزان ۷۰۰ میکرولیتر به ویال حاوی استاندارد (CN: KPG-MIGES) بافر رقیق کننده اضافه نموده و سپس به مدت ۱۰ دقیقه در دمای محیط انکوبه کنید. در این حالت استاندارد حاوی ۵۰۰ نانوگرم بر میلی لیتر از IgE می باشد و استاندارد شماره ۵ کیت محسوب می شود.

- مطابق شکل زیر، به میزان ۱۰۰ میکرولیتر از ویال استاندارد شماره ۵ (CN: KPG-MIGES) به ویال استاندارد شماره ۴ منتقل کرده و به شدت مخلوط کرده و به مدت ۳ دقیقه انکوبه کنید. این عمل را تا استاندارد شماره ۱ ادامه دهید. دقت داشته باشید که برای رسیدن به جواب بهینه، انکوباسیون ۳ دقیقه ای حتما رعایت شود. در این حالت استاندارد شماره ۴ دارای غلظت ۱۶۶/۶، استاندارد شماره ۳ دارای غلظت ۵۵/۵، استاندارد شماره ۲ دارای غلظت ۱۸/۵، استاندارد شماره ۱ دارای غلظت ۶/۱ نانوگرم بر میلی لیتر می باشد. دقت بفرمایید که استاندارد صفر (CN: KPG-MIGESz) از قبل در کیت فراهم شده است.



حساسیت کیت حاضر به میزان ۶ نانوگرم بر میلی لیتر و دقت آن Inter assay< %10, Intra assay< %3 می باشد.

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

نحوه کار با کیت برای اندازه گیری IgE

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

۲. به ویال A1 به میزان ۶۰ میکرولیتر از استاندارد شماره ۵ با غلظت ۵۰۰ نانوگرم بر میلی لیتر، به ویال B1 به میزان ۶۰ میکرولیتر از استاندارد شماره ۴ (۱۶۶/۶ نانوگرم بر میلی لیتر)، به ویال C1 به میزان ۶۰ میکرولیتر از استاندارد شماره ۳ (۵۵/۵ نانوگرم بر میلی لیتر)، به ویال D1 به میزان ۶۰ میکرولیتر از استاندارد شماره ۲ (۱۸/۵ نانوگرم بر میلی لیتر)، به ویال E1 به میزان ۶۰ میکرولیتر از استاندارد شماره ۱ (۶/۱ نانوگرم بر میلی لیتر) و به ویال F1 به میزان ۶۰ میکرولیتر از استاندارد صفر ($CN: KPG-MIGES_{zero}$) اضافه کنید.

۳. به میزان ۳۰ میکرولیتر به باقی ویال ها از محلول رقیق کننده اضافه کنید.

۴. به میزان ۳۰ میکرولیتر نمونه مورد نظر را به ویال هایی که محلول رقیق کننده اضافه شده، اضافه کنید (در واقع در ویال مربوط به نمونه ها، ۳۰ میکرولیتر از بافر رقیق کننده و ۳۰ میکرولیتر نمونه اضافه باید بشود).

۵. به مدت ۲ ساعت بر روی شیکر (400 rpm) و در دمای محیط انکوبه کنید.

۶. 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.

۷. به میزان ۶۰ میکرولیتر از آنتی بادی کونژوگه به تمامی حفره ها اضافه کنید و به مدت ۱ ساعت در دمای اتاق و بر روی شیکر (400 rpm) انکوبه کنید.

۸. 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.

۹. به میزان ۶۰ میکرولیتر از محلول HRP-Avidin به تمامی حفره ها اضافه کنید و به مدت ۱ ساعت در دمای اتاق و بر روی شیکر (400 rpm) انکوبه کنید.

۱۰. 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.

۱۱. به میزان ۶۰ میکرولیتر از سوبسترا به تمامی حفره ها اضافه کنید و به مدت ۱۵ دقیقه در دمای اتاق انکوبه کنید.

۱۲. به میزان ۳۰ 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.

نکته مهم: در بسیاری از موارد به ویژه در مدل های آلرژی، میزان IgE سرم بسیار بالا می باشد. بنابراین برای تشخیص میزان صحیح IgE بایستی نمونه قبل از اضافه شدن به چاهک ها حتی تا ۲۵ برابر با استفاده از بافر رقیق کننده رقیق شود. بنابراین در مواردی که میزان IgE در نمونه بالا است مجددا با رقیق کردن نمونه، تست را تکرار کنید.

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. عدم استفاده از شیکر و 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.

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