



کیت تشخیصی میزان سایتوکین IL-17A رت (صرفاً برای بررسی در تحقیقات)

• محتویات کیت:

۱. پلیت کوت شده با آنتی بادی ضد IL-17A رت (CN: KPG-RI17P)، استاندارد (CN: KPG-R I17S)، ۳. استاندارد صفر (CN: KPG-R I17S_{zero})، ۴. آنتی بادی کوئزوگه (CN: KPG-R I17D)، ۵. HRP-Avidin (CN: KPG-HA)، ۶. سوپسترا (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:

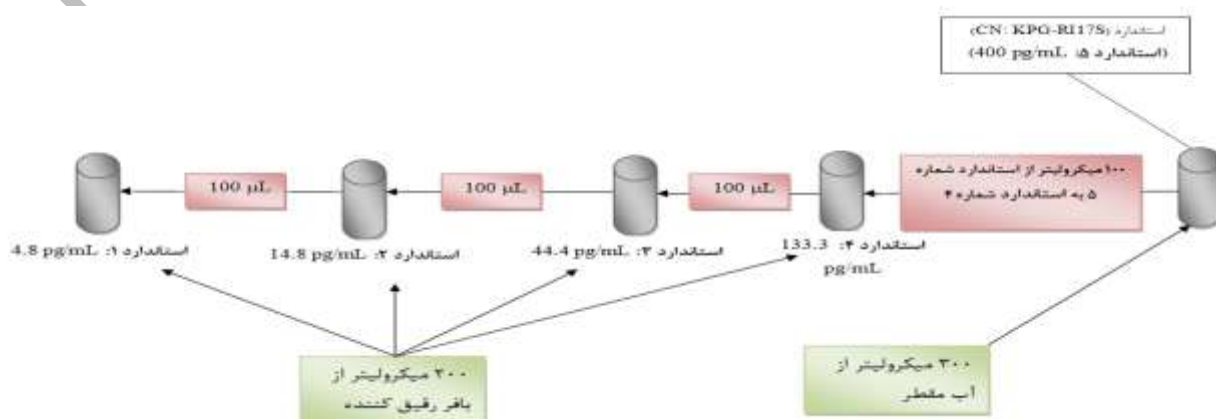
آنتی بادی های مورد استفاده شده در این کیت قادر به شناسایی IL-17A رت در نمونه سرم، پلاسما، مایع مغزی-نخاعی و سوپرناتانت کشت سلولی می باشند.

• توضیحی کوتاه در خصوص IL-17A:

IL-17A سایتوکینی التهابی است که توسط لنفوسیت های T کمکی نوع ۱۷ (Th17) تولید می شود. این سایتوکین، دارای خواص التهابی فراوانی است و بر روی تعداد یادی از سلول های ایمنی دارای گیرنده می باشد. از این رو قادر به تنظیم و القا پاسخ در سلول های سیستم ایمنی می باشد. IL-17A نقش مهمی در ایجاد پاسخ سیستم ایمنی بر علیه عفونت های باکتریال و قارچی دارا می باشد. این سایتوکین یکی از عوامل اصلی درگیر در ایجاد بیماری های خود ایمنی می باشد. بنابراین این سایتوکین به عنوان یک شاخص التهابی کاربرد فراوانی در مطالعات آزمایشگاهی برای بررسی وضعیت بیماری های خود ایمنی و التهابی دارا می باشد. کیت حاضر با استفاده از آنتی بادی های مونوکلونال ضد IL-17A رت طراحی و تولید شده است، بنابراین در اندازه گیری موارد مشابه حیوانی و انسانی کاربرد ندارد.

• نحوه آماده سازی استاندارد:

۱. ابتدا ۴ ویال ۵۰۰ میکرولیتری استریل آماده نموده و به ویال ها ۲۰۰ میکرولیتر از بافر رقیق کننده اضافه نمایید. این ویال ها را با نام استاندارد شماره ۱ تا ۴ نامگذاری کنید.
۲. در ادامه به میزان ۳۰۰ میکرولیتر به ویال حاوی استاندارد (CN: KPG-R I17S) آب مقطر استریل دوبار تقطیر اضافه نموده و سپس به مدت ۱۰ دقیقه در دمای محیط انکوبه کنید. محلول ایجاد شده دارای ۴۰۰ پیکوگرم بر میلی لیتر از سایتوکین IL-17A می باشد و استاندارد شماره ۵ کیت محسوب می شود.
۳. مطابق شکل زیر، به میزان ۱۰۰ میکرولیتر از ویال استاندارد (CN: KPG-R I17S) به ویال استاندارد 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 ۱۳۳/۳، استاندارد شماره ۳ دارای غلظت ۴۴/۴، استاندارد شماره ۲ دارای غلظت ۱۴/۸ و استاندارد شماره ۱ دارای غلظت ۴/۸ پیکوگرم بر میلی لیتر می باشد.



دقت نمایید که بعد از محلول کردن استاندارد و خارج نمودن از حالت لیوفلیزه، بایستی در همان موقع استاندارد مورد استفاده قرار گیرد و قابل نگهداری نمی باشد. حساسیت کیت حاضر به میزان ۲ پیکوگرم بر میلی لیتر و دقت آن $3\% < \text{Intra assay}$, $8\% < \text{Inter assay}$ می باشد.

نحوه کار با کیت برای اندازه گیری IL-17A

برای اندازه گیری IL-17A 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 به میزان ۶۰ میکرولیتر از استاندارد اصلی (استاندارد شماره ۵ (CN: KPG-R I17S) با غلظت ۴۰۰ پیکوگرم بر میلی لیتر)، به چاهک B1 به میزان ۶۰ میکرولیتر از استاندارد شماره ۴ (۱۳۳/۳) پیکوگرم بر میلی لیتر)، به چاهک C1 به میزان ۶۰ میکرولیتر از استاندارد شماره ۳ (۴۴/۴) پیکوگرم بر میلی لیتر)، به چاهک D1 به میزان ۶۰ میکرولیتر از استاندارد شماره ۲ (۱۴/۸) پیکوگرم بر میلی لیتر)، به چاهک E1 به میزان ۶۰ میکرولیتر از استاندارد شماره ۱ (۴/۸) پیکوگرم بر میلی لیتر) و به چاهک F1 به میزان ۶۰ میکرولیتر از استاندارد صفر (CN: KPG-R I17S_{zero}) که در کیت به صورت آماده وجود دارد، اضافه کنید.
۳. به میزان ۶۰ میکرولیتر به باقی ویال ها نمونه مورد نظر را اضافه کنید.
۴. به مدت ۲ ساعت بر روی شیکر و در دمای ۳۷ درجه سانتیگراد و یا ترجیحاً به مدت ۲۰ ساعت در دمای ۴ درجه سانتیگراد انکوبه کنید.
۵. 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 در دمای اتاق انکوبه کنید و سپس تخلیه نمایید.
۶. 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 انکوبه کنید.
۷. 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 در دمای اتاق انکوبه کنید و سپس تخلیه نمایید.
۸. به میزان ۶۰ میکرولیتر از محلول HRP-Avidin به تمامی حفره ها اضافه کنید و به مدت نیم ساعت در دمای اتاق انکوبه و بر روی شیکر کنید.
۹. بعد از انکوباسیون مناسب، با استفاده از محلول شستشو پلیت ها را ۵ مرتبه شستشو دهید.
۱۰. به میزان ۶۰ میکرولیتر از سوبسترا به تمامی حفره ها اضافه کنید و به مدت ۱۵ دقیقه در دمای اتاق و بر روی شیکر انکوبه کنید.
۱۱. 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.

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 استاندارد 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. در صورت 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 استاندارد 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 تعوییه 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 کار بردن محلول هایی غیر از محلول های شرکت کارمانیا پارس ژن خودداری فرمایید.

با ما تماس بگیرید: