کیت اندازه گیری TGF-β موشی/انسانی ۴۸ تستی

(CN: KPG- TGF-β)

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

محتویات کیت:

محتوی	کاتالوگ نامبر	حجم
Human anti- TGF-β pre-coated plate	KPG-TGFP	۴۸ چاهک
Standard	KPG- TGFSN	۳۰ میکرو لیتر
HRP-Avidin	KPG-HA	۲/۵ میلی لیتر
HRP	KPG-HAA	۱۱ میکرولیتر
Substrate	KPG-SU	۲/۵ میلی لیتر
Stopping	KPG-ST	۳/۵ میلی لیتر
10X washing buffer	KPG-WB	۲۰ میلی لیتر
Detection Ab	KPG-TGFD	۲/۵ میلی لیتر
NaOH 1N	KPG-NA1N	۲ میلی لیتر
HCL 1N	KPG-HCL1N	۲ میلی لیتر
Elution buffer	KPG-EBE	۳ میلی لیتر

نحوه آماده سازی استاندارد:

جهت آماده سازی استاندارد ابتدا ویال استاندارد را به دمای اتاق برسانید سپس به میزان ۵ میکرولیتر از ویال استاندارد در یک میکروتیوب ۱/۵ سی سی که از قبل از ویالElution buffer به آن مقدار ۱ سی سی اضافه کرده مخلوط کنید سپس به میزان ۲۰۰میکرولیتر از ویال HCL1n به آن اضافه و پس از مدت ۱۰ ثانیه ورتکس به میزان ۲۰۰ میکرولیتر از ویال NaOH به آن اضافه کرده و به مدت ۱۰ ثانیه ورتکس کنید سپس به چاهک های A1 الی D1 به میزان ۵۰ میکرولیتر از ویال Elution Buffer اضافه کرده سپس به چاهک E1 و D1 به میزان ۵۰ میکرولیتر از استاندارد آماده شده اضافه کرده و از چاهک D1 به میزان ۵۰ میکرولیتر برداشته و به چاهک C1 اضافه نموده و و از چاهک C1 به میزان ۵۰ میکرولیتر برداشته و به چاهک B1 اضافه کنید و همچنین چاهک A1 را به عنوان بلانک در نظر بگیرید، سپس مطابق جدول زیر od های بدست امده را جهت ثبت در دستگاه الایزا ریدر در طول موج ۴۵۰ نانومتر وارد کنید .

استاندارد	Pg/ml	OD
A1 Blank	۰ پیکوگرم بر میلی لیتر	0.08-0.05
B1 استاندارد ۱	۲۵ پیکوگرم بر میلی لیتر	0.3-0.1
C1استاندارد ۲	۵۰ پیکوگرم بر میلی لیتر	0.8-0.6
D1استاندارد ۳	۱۰۰ پیکوگرم بر میلی لیتر	1.8-1.2
E1 استاندارد ٤	۲۰۰ پیکوگرم بر میلی لیتر	3 -2.6

حساسیت کیت حاضر به میزان ۲پیکوگرم بر میلی لیتر

دقت کیت inter assay< %8-10, Intra assay< %3-4

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 پس از فعال سازی با اسید، تا ۸ بار رقت سازی به نسبت یک دوم انجام دهید. رقت مناسب بایستی دارای حداکثر OD: 1/5 باشد. نمونه بافت باید در بافر ریپا که حاوی آنتی پروتئاز است هموزنایز شود.

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.

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 ۱/٤ 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 ۱/٤ 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.

آماده سازی محلول ها:

Washing Buffer

برای آماده سازی محلول شستشو می بایست این محلول را با آب مقطر ۱۰ برابر رقیق کنید.

HRP-Avidin

برای آماده سازی محلول HRP-Avidin ابتدا ویال HRP را با استفاده دستگاه میکروفیوژ اسپین کرده سپس به میزان ۵۰۰ میکرولیتر از ویال HRP-Avidin به ویال HRP اضافه کرده و پس از ورتکس تمامی محتوی آن را به ویال HRP-Avidin اضافه کنید و به مدت ۳ دقیقه با دست تکان دهید تا به خوبی مخلوط گردد

دقت کنید محتوی آماده شده فقط به مدت یک هفته پایداری دارد.

قبل از شروع تست از بی رنگ بودن محلول Substrate اطمینان حاصل کنید.

نحوه کار با کیت برای اندازه گیری

۱- پلیت را از بسته مورد نظر خارج کرده و در محیطی خشک به دمای اتاق برسانید. طبق دستور عمل آماده سازی استاندارد ها ، استانداردها را آماده و به چاهک ها اضافه کنید و تمامی مراحل بجز مرحله ٤ و ٦ را برای بلانک اجرا کنید.

۲- به میزان ۵۰ میکرولیتر به باقی چاهک ها نمونه مورد نظر را اضافه کنید و به مدت ۵۰ دقیقه بر روی شیکر سرعت ۱۰۰ RPM در دمای اتاق انکوبه کنید .(استفاده از چسب پهن بر روی پلیت جهت جلوگیری از تبخیر الزامی است)

۳- بعد از انکوباسیون مناسب، با استفاده از محلول شستشو پلیت ها را ۳ مرتبه به میزان ۲۵۰ میکرولیتر شستشو دهید(بعد از اضافه کردنمحلول شستشو، پلیت ها را به مدت تقریبی ۱ دقیقه دردمای اتاق انکوبه کنید و سپس تخلیه نمایید)

٤- به میزان ۵۰ میکرولیتر از آنتی بادی کونژوگه(Detection ab) به تمامی چاهک ها (به جز بلانک A1)اضافه کنید و به مدت ۵۰ دقیقه بر روی شیکر سرعت ۱۰۰ RPM در دمای اتاق انکوبه کنید.

۵- بعد از انکوباسیون مناسب، با استفاده از محلول شستشو پلیت ها را ۳ مرتبه به میزان ۲۵۰ میکرولیتر شستشو دهید.

٦- به میزان ۵۰ میکرولیتر از محلول HRP-Avidin به تمامی چاهک ها (به جز بلانکA1) اضافه کنید و به مدت۳۰ دقیقه بر روی شیکر (حداقل در دور RPM ۱۰۰) انکوبه کنید.

۷- بعد از انکوباسیون مناسب، با استفاده از محلول شستشو پلیت ها را ۵ مرتبه به میزان ۲۵۰ میکرولیتر شستشو دهید.

۸- به میزان ۵۰ میکرولیتر از سوبسترا به تمامی چاهک ها اضافه کنید و به مدت ۱۰ دقیقه انکوبه کنید. دقت نمایید که زمان ۱۰ دقیقه برای انکوباسیون کافی است اما درصورتی که میزان رنگ تولیدی زیاد باشد، زمان را می توان کاهش داد.

۹- به میزان ۲۵ میکرولیتر از محلول متوقف کننده به تمامی چاهک ها اضافه کنید و میزان جذب نمونه ها در دستگاه الیزا ریدر در طول موج ٤۵۰ نانومتر مورد اندازه گیری قرار گیرد.

مشکلات ایجادشده و راه حل آن ها

مشکل ایجاد شده	علت	برطرف کردن مشکل
رنگ زمینه ای زیاد ایجاد می شود	**عدم شستشوی کامل و کافی**	**میزان محلول شستشو را افزایش دهید. زمان انکوباسیون محلول شستشو را افزایش دهید.**
	آلودگی متقاطع از نمونه های دیگر و استاندارد	**تست را تکرار کنید و در زمان اضافه کرن نمونه ها دقت کنید.**
	مقادیر مناسبی از محلول ها اضافه نشده است	**در مواردی که تعداد تست کم باشد در برداشتن محلول HRP دقت زیادی کنید زیرا غوطه ور کردن سرسمپلر در محلول منجر به افزایش برداشت این محلول شده و منجر به افزایش رنگ زمینه ای می شود. در زمان برداشت HRP حتما از لبه بالایی آن برداشت کنید.**
	سوبسترا رنگی است	**سوبسترا در بدو استفاده بی رنگ باشد.**
استاندارد فاقد رنگ است	**استاندارد مشکل پیدا کرده است**	درصورتیکه نمونه ها دارای OD های متفاوت هستند اما استاندارد فاقد رنگ مناسب باشد نشان دهدنه این است که استاندارد مشکل دارد و دیگر اجزای کیت درست عمل کرده است. دلیل نگهداری طولانی مدت استاندارد خارج از دمای ۲۰-درجه سانتیگراد و فریز و باز کردن مکرر آن می باشد.
	آماده سازی HRP-Avidin بیش از ۷ روز قبل.	**HRP-Avidin را به صورت تازه آماده سازی کنید.**
	وجود ممانعت کننده HRP در سر سمپلر	**درصورتیکه تمام نمونه ها و استاندارد هیچگونه رنگی تولید نکنند، احتمالا در سر سمپلر و یا آب مورد استفاده برای محلول شستشو دارای ممانعت کنده برای HRP هستید.**

ایمنی حین استفاده از کیت

محلول های مورد استفاده در کیت دارای خواص اکسیدانی و اسیدی می باشند. از تماس مستقیم با پوست و چشم به شدت اجتناب کنید. درصورت تماس با بافت های مورد اشاره با میزان فراوان آب شستشو دهید و به نزدیکترین محل درمانی مراجعه کنید.

توضیحی در خصوص شرکت کارمانیا پارس ژن

شرکت کارمانیا پارس ژن از سال ۱۳۹۵ تاسیس گردید. در ابتدای امر با تولید کیت الایزا برای اندازه گیری TNF-alpha انسانی شروع به کار کرد. در ادامه با تلاش زیاد و خستگی ناپذیر به تولید کیت های بیشتر در زمینه سایتوکین ها، اکسیدان ها و آنتی اکسیدان ها روند رو به پیشرفت خود را تکمیل کرد. اکنون شرکت کارمانیا پارس ژن با ورود به تولید اقلامی از جمله ستون های استخراج DNA/RNA و موارد مصرفی مانند میکروتیوب های دستگاه های Real-Time PCR و سر سمپلر های فیلتر دار، قسمت اعظمی از نیاز آزمایشگاه های داخل کشور را تامین می کند. مؤسسین این شرکت از برجسته ترین اساتید دانشگاه هستند که با اتصال علم به صنعت و با همکاری با مهندسین در رشته های مختلف در راستای بی نیاز کردن کشور عزیزمان از کالاهای وارداتی گامی بزرگ برای حفظ عزت مردم عزیز کشورمان برداشته اند. همکاران ما و همچنین شما محققین گرامی بزرگترین شاخص قدرت ما هستید.

آدرس کارخانه

رفس

نجان، ۲۰ کیلومتر جاده رفسنجان به کرمان

ناحیه غذا و دارو منطقه ویژه اقتصادی رفسنجان

شماره تماس ثابت : ۰۲۱-۹۱۶۹۲۲۹۶

شماره همراه ۰۹۱۳۲۹۲۶۱۱۳

۰۹۱۳۵۰۲۵۹۸۳

ایمیل : Karmaniaparsgene@gmail.com

وب سایت: www.karmaniaparsgen.ir

سایر کیت های الایزا تولید شده شرکت کارمانیا پارس ژن

Rat	Mouse	Human
TNF-α	IL-1β	IL-1β
IL-1β	IL-2	IL-2
IL-6	IL-4	IL-4
IL-10	IL-6	IL-6
IL-17A	IL-10	IL-8
	IL-13	IL-10
	IL-33	IL-12
	IL-18	IL-13
	TNF-α	IL-18
	TGF- β	IL-23
	CCL3	IL-29
	IFN-γ	IL-17A
	Total IgG	TGF-β
	Total IgE	VEGF
		TNF-α
		IFN-γ
		CCL2 (MCP-1)
		CCL3 (MIP-1-alpha)
		CXCL10 (IP-10)
		CXCL12 (SDF-1)
		CCL21

لیست کیت های الایزا در حال به روز شدن می باشد.