



کیت اندازه گیری TGF-β موشی/انسانی

(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 پادی 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 هئوستاز به دنبال عفونتهای میکروبی و همچنین جلوگیری از ایجاد بیماری های خود ایمنی می باشد. بنابراین این سایتوکین به عنوان یک شاخص عمدتاً 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 دارد.

محتوی	کاتالوگ نامبر	۹۶ تستی	۴۸ تستی
H/MTGF-b plates	KPG- H/MTGF-bP	۹۶ چاهک	۴۸ چاهک
Standard	KPG- H/MTGF-bS	۱۰۰ میکرو لیتر	۱۰۰ میکرو لیتر
HRP-Avidin	KPG-HA	۳ میلی لیتر	۲/۵ میلی لیتر
HRP	KPG-HAA	۵۰ میکرولیتر	۵۰ میکرولیتر
Substrate	KPG-SU	۵/۵ میلی لیتر	۲/۵ میلی لیتر
Stopping	KPG-ST	۳/۵ میلی لیتر	۳/۵ میلی لیتر
10X washing buffer	KPG-WB	۴۰ میلی لیتر	۲۰ میلی لیتر
Detection Ab	KPG- H/MTGF-bD	۳ میلی لیتر	۲/۵ میلی لیتر
Elution buffer	KPG-EBE	۵ میلی لیتر	۵ میلی لیتر

مواد مورد نیاز:

میکروتیوب	آب مقطر استریل دوبار تقطیر
انواع سمپلر و سرسمپلر	دستگاه میکروقیوژ
الایزا ریدر (طول موج ۴۵۰ نانومتر)	

نحوه آماده سازی استاندارد:

استاندارد در کیت نیاز به آماده سازی دارد. برای ساخت استاندارد با غلظت ۳۰۰ پیکوگرم بر میلی لیتر (استاندارد شماره ۴) میزان ۱۵ میکرولیتر از استاندارد را در ۱ سی سی Elution buffer مخلوط کنید (در ادامه برای ساخت غلظت های ۳۳، ۱۰۰ و ۱۱ (استاندارد های شماره ۳، ۲ و ۱) سه میکروتیوب آماده کرده و ضمن شماره گذاری، به میزان ۲۰۰ میکرولیتر از Elution buffer به تمام میکروتیوب ها اضافه کنید. در ادامه به میزان ۱۰۰ میکرولیتر از استاندارد شماره ۴ (آماده شده در مرحله قبل) را به میکروتیوب استاندارد شماره ۳ اضافه کنید و بعد از مخلوط کردن کامل، ۱۰۰ میکرولیتر از استاندارد شماره ۳ به میکروتیوب استاندارد شماره ۲، و بعد از مخلوط کامل، ۱۰۰ میکرولیتر از استاندارد شماره ۲ به میکروتیوب استاندارد شماره ۱ اضافه کنید. در اینصورت استاندارد های شماره ۴ (۳۰۰ پیکوگرم بر میلی لیتر)، ۳ (۱۰۰ پیکوگرم بر میلی لیتر)، ۲ (۳۳ پیکوگرم بر میلی لیتر) و ۱ (۱ پیکوگرم بر میلی لیتر) آماده می شوند. دقت بفرمایید این عمل حتما در میکروتیوب و خارج از چاهک های الایزا انجام شود زیرا در دقت و صحت تست اثرگذار می باشد.

OD های داخل جدول از تست کنترل کیفی به دست آمده در این کیت می باشد.

استاندارد	Pg/ml	OD -450nm
A1 Blank	۰ پیکوگرم بر میلی لیتر	0.3-0.09
استاندارد ۱ B1	۱۱ پیکوگرم بر میلی لیتر	0.5-0.3
استاندارد ۲ C1	۳۳ پیکوگرم بر میلی لیتر	1-0.5
استاندارد ۳ D1	۱۰۰ پیکوگرم بر میلی لیتر	1.5-1
استاندارد ۴ E1	۳۰۰ پیکوگرم بر میلی لیتر	2.5-1.7

حساسیت کیت حاضر به میزان ۲ پیکوگرم بر میلی لیتر

دقت کیت 3-4 % < intra assay< 8-10 % < inter assay

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 رپا هموزن 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 رپا 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 هموزنیزه 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.

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

را با استفاده HRP-ابتنای ویا ال HRP-Avidin برای آماده سازی محلول

دستگاه میکروقیوژ اسپین کرده سپس برای کیت ۹۶ تستی به میزان ۴۵

سی سی و برای کیت ۴۸ تستی ۳۵ را با HRP۳ میکرولیتر از محلول

HRP-Avidin را با ۲/۵ سی سی از محلول HRP۳ میکرولیتر از محلول

مخلوط کنید.

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

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 میزان ۵۰ میکرولیتر به چاهک ها اضافه کنید و تمامی مراحل بجز مرحله ۴ را برای بلانک اجرا کنید.

۲- به میزان ۵۰ میکرولیتر به باقی چاهک ها نمونه مورد نظر را اضافه کنید و به مدت ۴۰ 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 کردن محلول شستشو، پلیت ها را به مدت تقریبی ۱ دقیقه در دمای اتاق انکوبه کنید و سپس تخلیه نمایید).

۴- به میزان ۲۵ میکرولیتر از آنتی بادی کونژوگه (Detection ab) و ۲۵ میکرولیتر از محلول HRP-Avidin (آماده شده طبق دستورالعمل کیت) به تمامی چاهک ها (به جز بلانک A1) اضافه کنید و به مدت ۳۰ دقیقه بر روی شیکر سرعت ۱۰۰ RPM در دمای اتاق انکوبه کنید. دقت کنید می توانید مقادیر مناسب از آنتی بادی کونژوگه (Detection ab) و محلول HRP-Avidin (آماده شده طبق دستورالعمل کیت) را با هم مخلوط و از مخلوط به دست آمده به میزان ۵۰ میکرولیتر به چاهک ها اضافه کنید.

۵- بعد از انکوباسیون مناسب، با استفاده از محلول شستشو پلیت ها را ۵ مرتبه به میزان ۲۵۰ میکرولیتر شستشو دهید. دهید (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 ۵۰ میکرولیتر از سوبسترا به تمامی چاهک ها اضافه کنید و به مدت ۱۰ دقیقه در دمای اتاق 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 و بالعکس درصورتیکه میزان رنگ کم باشد تا ۱۵ دقیقه می توان زمان را افزایش داد.

۷- 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 ۴۵۰ نانومتر اندازه گیری کنید.

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 سرمپلر در محلول منجر به افزایش برداشت این محلول شده و منجر به افزایش رنگ زمینه ای می شود. در زمان برداشت HRP حتما از لیه بالایی آن برداشت کنید.
	سوپسترا رنگی است	سوپسترا در بدو استفاده بی رنگ باشد.
استاندارد فاقد رنگ است	استاندارد مشکل پیدا کرده است	در صورتیکه نمونه ها دارای OD های متفاوت هستند اما استاندارد فاقد رنگ مناسب باشد نشان دهنده 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 سرمپلر	وجود ممانعت کننده HRP در	در صورتیکه تمام نمونه ها و استاندارد هیچگونه رنگی تولید نکنند، احتمالا در سرمپلر و یا آب مورد استفاده برای محلول شستشو دارای ممانعت کننده برای HRP هستند.

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. در صورت 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 تا سیس 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 Real-Time PCR و سرمپلر های فیلتر دار، قسمت اعظمی از نیاز آزمایشگاه های داخل کشور را تامین می کند. مؤسسه این شرکت از برجسته ترین اساتید دانشگاه هستند که با اتصال علم به صنعت و با همکاری با مهندسين 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

رفسنجان، کیلومتر ۲۰ جاده رفسنجان به کرمان

ناحیه غذا و دارو منطقه ویژه اقتصادی رفسنجان

شماره همراه - واتساپ - بله - ایتا - تلگرام

۰۹۱۳۲۹۲۶۱۱۳

۰۹۱۳۵۰۲۵۹۸۳

ایمیل : Karmaniaparsgene@gmail.com

سایر کیت های الایزا تولید شده شرکت کارمانیا پارس ژن

Human	Mouse	Rat
IL-1β	IL-1β	TNF-α
IL-2	IL-2	IL-1β
IL-4	IL-4	IL-6
IL-6	IL-6	IL-10
IL-8	IL-10	IL-17A
IL-10	IL-13	
IL-12	IL-33	
IL-13	IL-18	
IL-18	TNF-α	
IL-23	TGF-β	
IL-29	CCL3	
IL-17A	IFN-γ	
TGF-β	Total IgG	
VEGF	Total IgE	
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.