



کیت اندازه گیری TNF-α Mouse

CN: KPG-MTNF- α

Lot N:



توضیحی کوتاه درخصوص TNF-α

TNF-α سایتوکینی التهابی است که عمدتاً توسط سلول های ایمنی ذاتی مانند ماکروفاژها تولید می شود. این سایتوکین، دارای خواص التهابی فراوانی است و نقش آن بر علیه عفونت های باکتریال، ویرال و قارچی به خوبی مشخص شده است. از طرفی این سایتوکین در ایجاد بیماری های با واسطه ایمنی سلولار نقش زیادی دارد. این سایتوکین عامل اصلی ایجاد بیماری شوک عفونی می باشد. بنابراین این سایتوکین به عنوان یک شاخص 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 TNF-α موشی طراحی و تولید شده است، بنابراین در اندازه گیری موارد مشابه حیوانی و انسانی کاربرد ندارد.

محتوی	کاتالوگ نامبر	۹۶ تستی	۴۸ تستی
TNF-a plates	KPG- MTNF-a P	۹۶ چاهک	۴۸ چاهک
Standard	KPG- MTNF-a S	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- MTNF-a D	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 میکروویوژ
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 ۱۰۰، ۳۳ 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
B1 استاندارد ۱	۱۱ پیکوگرم بر میلی لیتر	0.5-0.3
C1 استاندارد ۲	۳۳ پیکوگرم بر میلی لیتر	0.7-0.5
D1 استاندارد ۳	۱۰۰ پیکوگرم بر میلی لیتر	1-0.7
E1 استاندارد ۴	۳۰۰ پیکوگرم بر میلی لیتر	1.5-1

حساسیت کیت به میزان ۲ پیکوگرم بر میلی لیتر می باشد.

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

آماده سازی محلول ها:

Washing Buffer

برای آماده سازی محلول شستشو 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 میکروویوژ اسپین کرده سپس برای کیت ۹۶ تستی به میزان ۳۷ میکرولیتر از محلول HRP را با ۲/۵ سی سی از محلول HRP-Avidin مخلوط کنید.

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

قبل از شروع کار با کیت، از بی رنگ بودن محلول Substrate اطمینان حاصل کنید.

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 رپیا هموزن کرده و سپس 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 رپیا که حاوی آنتی پروتئاز است هموزنایز شود. (بافر رپیا درکیت موجود نمی باشد جهت خرید با ما در ارتباط باشید)

10 Min مدت زمان RPM 10.000 سرعت سانتریفیوژ

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 در صورتی که میزان رنگ تولیدی زیاد باشد، زمان را می توان کاهش داد و بالعکس در صورتیکه 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	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.
استاندارد فاقد رنگ است	سوبسترا رنگی است	سوبسترا در بدو استفاده بی رنگ باشد.
	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 سر سمپلر	وجود ممانعت کننده HRP در	در صورتیکه تمام نمونه ها و استاندارد هیچگونه رنگی تولید نکنند، احتمالا در سر سمپلر 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 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 سابتوکین 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. مؤسسين این شرکت از برجسته ترین اساتید دانشگاه هستند که با اتصال علم به صنعت و با همکاری با مهند سین 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- ایتم-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	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.