بسمه تعالی

کیت تشخیصی میزان سایتوکین IL-6 انسانی (صرفا برای بررسی در تحقیقات)

محتویات کیت:

۱. پلیت کوت شده با آنتی بادی ضد IL-6 انسانی (CN: KPG-HI6P)، ۲. استانداردهای شماره ۱-۴ (CN: KPG-HI6S1-4)، ۳. آنتی بادی کونژوگه(Detection Ab) (CN: KPG-HI6D)، ۴. HRP-Avidin (CN: KPG-HA)، ۵. سوبسترا (CN: KPG-SU)، ۶. محلول متوقف کننده (CN: KPG-ST)، ۷. محلول شستشو 10X (CN: KPG-WB)، ۸. HRP Dilution (CN :KPG-DH)، ۹. HRP (CN : KPG-HAA)

مواد مورد نیاز که در کیت وجود ندارد: ۱. دستگاه الیزا ریدر، ۲. آب مقطر استریل دوبار تقطیر، ۳. انواع سمپلر و سرسمپلر ۴.دستگاه میکروفیوژ(سانتریفیوژ)

نمونه مورد استفاده: آنتی بادی های مورد استفاده شده در این کیت قادر به شناسایی IL-6 در نمونه سرم، پلاسما، مایع مغزی-نخاعی و سوپرناتانت کشت سلولی می باشند.

توضیحی کوتاه درخصوص IL-6:

IL-6 سایتوکینی التهابی است که عمدتا توسط 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 نیز نقش زیادی دارد. 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 IL-6 انسانی طراحی و تولید شده است، بنابراین در اندازه گیری موارد مشابه حیوانی کاربرد ندارد.

استاندارد :

- استانداردهای موجود موجود در کیت آماده کار و دارای ۲۰۰ پیکوگرم بر میلی لیتر از سایتوکین IL-6 برای استاندارد شماره ۴ (CN: KPG-HI6S4)، ۱۰۰ پیکوگرم بر میلی لیتر از سایتوکین IL-6 برای استاندارد شماره ۳ (CN: KPG-HI6S3)، ۵۰ پیکوگرم بر میلی لیتر از سایتوکین IL-6 برای استاندارد شماره ۲ (CN: KPG-HI6S2) و ۰ پیکوگرم بر میلی لیتر از سایتوکین IL-6 برای استاندارد شماره ۱ (CN: KPG-HI6S1) می باشد.

- دقت داشته باشید در این کیت به طور معمول استاندارد شماره ۴ دارای OD بین ۱/۴-۱/۶، استاندارد شماره ۳ دارای OD بین ۰/۷-۱، استاندارد شماره ۲ دارای OD بین ۰/۳-۰/۵ و استاندارد شماره ۱ دارای OD بین ۰/۰۸-۰/۰۵ می باشند. حساسیت کیت حاضر به میزان ۳ پیکوگرم بر میلی لیتر و دقت آن Inter assay< %9, Intra assay< %3 می باشد.

محدوده طبیعی IL-6

میزان طبیعی سایتوکین IL-6 در جوامع مختلف متفاوت است اما معمولا در محدوده بین ۰ تا ۱۰ پیکوگرم بر میلی لیتر می باشد.

نحوه آماده سازی محلول ها

- **محلول شستشو:** برای آماده سازی محلول شستشو (Washing Buffer) می بایست این محلول قبل از کار با استفاده از آب مقطر، ۱۰ برابر رقیق شود.
- **HRP-Avidin:** به میزان ۱۱۰ میکرولیتر از ویال HRP Dilution به ویال HRP-Avidin اضافه نموده و همچنین ویال HRP را با دستگاه میکروفیوژ اسپین کرده و تمام آن را به ویال HRP-Avidin اضافه کنید. برای عملکرد بهتر، میزان ۱۰۰ میکرولیتر از ویال HRP-Avidin به ویال HRP اضافه نمایید و بعد از چند بار سمپلینگ تمامی محتوای ویال را به ویال HRP-Avidin اضافه نمایید. دقت نمایید HRP رقیق شده بیش از یک هفته پایدار نیست. اگر تعداد نمونه های تهیه شده کمتر از ۹۶ عدد می باشد (به عنوان مثال ۴۸ نمونه) مقادیر را می توانید به همان نسبت مثلا با نسبت $\frac{1}{2}$ رقیق کنید.

درصورتی که مقادیر کمتر از کیت مورد استفاده قرار می گیرد، به ازای هر ردیف ۸ چاهکی، ۴۵۰ میکرولیتر از HRP-Avidin، ۱۱ میکرولیتر از HRP و ۹ **میکرولیتر از HRP Dilution را با یکدیگر مخلوط 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 ریپا هموژن کرده و سپس تا ۸ بار رقت سازی به نسبت یک دوم انجام دهید. رقت مناسب بایستی دارای حداقل OD: 1/5 باشد.

Karmania Pars Gene
http://kpgene.ir
09132926113
@karmaniaparsgene1
info@kpgene.ir
karmaniaparsgene

نحوه کار با کیت برای اندازه گیری IL-6 انسانی

برای اندازه گیری **IL-6 انسانی** 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. در ادامه به چاهک A1 تا D1 به میزان ۵۰ میکرولیتر از استاندارد های شماره ۴-۱ اضافه کنید.

۲. به باقی چاهک ها به میزان ۵۰ میکرولیتر نمونه مورد نظر را اضافه و به مدت ۱ ساعت بر روی شیکر (دور 180 RPM) و دمای اتاق انکوبه کنید.

۳. 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. بعد از تخلیه محلول شستشو، در صورت استفاده از روش دستی، پلیت ها را با ضربه زدن بر روی دستمال کاغذی به خوبی تخلیه نمایید.

۴. به میزان ۵۰ میکرولیتر از آنتی بادی کونژوگه (Detection Ab) به تمامی چاهک ها اضافه کنید و به مدت ۱ ساعت بر روی شیکر (دور 180 RPM) و دمای اتاق انکوبه کنید.

۵. بعد از انکوباسیون مناسب، با استفاده از محلول شستشو پلیت ها را ۳ مرتبه شستشو دهید. بعد از تخلیه محلول شستشو، در صورت استفاده از روش دستی، پلیت ها را با ضربه زدن بر روی دستمال کاغذی به خوبی تخلیه نمایید.

۶. به میزان ۵۰ میکرولیتر از محلول HRP-Avidin به تمامی چاهک ها اضافه کنید و به مدت نیم ساعت بر روی شیکر (دور 180 RPM) و دمای اتاق انکوبه کنید.

۷. بعد از انکوباسیون مناسب، با استفاده از محلول شستشو پلیت ها را ۵ مرتبه شستشو دهید. بعد از تخلیه محلول شستشو، در صورت استفاده از روش دستی، پلیت ها را با ضربه زدن بر روی دستمال کاغذی به خوبی تخلیه نمایید.

۸. به میزان ۵۰ میکرولیتر از سوبسترا به تمامی چاهک ها اضافه کنید و به مدت ۱۵ دقیقه در دمای اتاق و بر روی شیکر و دمای اتاق انکوبه کنید. دقت نمایید که زمان ۱۵ دقیقه برای انکوباسیون کافی است اما درصورتی که میزان رنگ تولیدی کم باشد، زمان را تا ۲۰ دقیقه می توان افزایش 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 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 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. 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. در برخی مواقع میزان OD استاندارد صفر ممکن است بیش از عدد ۰/۰۹ باشد. دلیل احتمالی این امر عدم شستشوی مناسب باشد. برای رفع این مشکل بهتر است بعد از اضافه کردن محلول شستشو، پلیت را به مدت ۱ دقیقه بر روی شیکر قرار دهید سپس تخلیه نمایید. همچنین می توان پایین ترین OD مربوط به نمونه ها را به عنوان صفر برای دستگاه تعریف کرد تا تمامی نمونه ها در رنج قابل اندازه گیری قرار بگیرند.

نکته مهم: با توجه به اینکه سطح سرمی سایتوکین ها در جوامع مختلف با یکدیگر متفاوت است، بنابراین درصورتی که از این کیت برای بررسی سطح سرمی بیمار مبتلا به COVID-19 استفاده می شود، دقت نمایید که برای تعیین ایندکس درمان ضد IL-6 و یا گیرنده آن بایستی ابتدا ۵ تا ۱۰ نمونه سرم از افراد سالم از نظر سطح سرمی IL-6 با این کیت مورد بررسی قرار گیرند سپس درصورتی که بیمار سطح سرمی ۲ یا ۳ برابر افراد سالم داشته باشد و با داده های بالینی مطابقت داشته باشد، پیشنهاد درمان بر علیه IL-6 و یا گیرنده آن داده شود.