KIAZIST Life Sciences

کیت فوق حساس اندازه گیری
ظرفیت تام آنتی اکسیدانی
(TAC)

KTAC-96

اصول کار

آنتی اکسیدان ها اولین سد دفاعی بدن در مقابل رادیکال های آزاد هستند که خود موجب بسیاری از بیماری ها می باشند. ظرفیت تام آنتی اکسیدانی (TAC) اشاره به میزان کلی مواد آنتی اکسیدانی در نمونه بیولوژیک دارد و تغییرات آن سهم بزرگی در ایجاد بیماری های مرتبط با افزایش رادیکال های آزاد دارد.

در این آزمایش کوپریک (Cu^{+2}) در حضور آنتی اکسیدان ها به کوپرو (Cu^{+1}) احیا می شود و درحضور کروموژن رنگ تولید می کند. این رنگ در طول موج ۴۵۰ نانومتر جذب دارد و قابل خوانش است. مزیت این روش اندازه گیری آنتی اکسیدان هایی همچون تیول می باشد که در روش هایی همچون FRAP (که با آهن کار می کند) مشخص نمی شوند.

میزان جذب با مقدار آنتی اکسیدان رابطه مستقیم دارد . این میزان در طول موج ۴۵۰ نانومتر قابلیت خوانش دارد.

نگهداری و حمل:

در دمای ٤ درجه سانتی گراد نگهداری شود. حمل توسط یخ مرطوب انجام می شود.

Trolox Standard در دمای -20°C نگهداری شود.

محدوده اندازه گیری دینامیک: 40-400 nmol/mL

حساسیت:20 nmol/mL Trolox Equivalent

مقدار نمونه پیشنهادی

نمونه	حداکثر	مطلوب
Tissues from animal/plant	30 mg	20 mg
Cells	1.5×10^6	5×10^5 –1×10^6
Serum	10 µl	5-10 µl

محتویات کیت

شماره	ماده	مقدار/تعداد
1	TAC Buffer	20 mL
2	Cu^{+2} Solution	0.2 mL
3	Chromogen	0.2 mL
4	Trolox Standard	Powder
5	TAC DMSO	100 uL
6	96-well Clean photometric Plate	1 PCs

موارد مورد نیاز اضافی

- ست سمپلر متغیرو چند کاناله
- سرسمپلر مناسب
- میکروتیوب ۱/۵ میلی لیتری
- سانتریفیوژ دور بالا (12000 RPM)
- آب دیونیزه
- دستگاه Plate Reader با طول موج ۴۵۰
- بافر PBS

نکته: قبل از شروع، آزمایش با یک نمونه جهت مشخص ساختن مقدار نمونه به صورت پایلت (Pilot) به همراه یک استاندارد انجام شود.

***قبل از انجام تست کل پروتکل را بخوانید**

هموژن کردن بافت

نمونه بافت: ۱۰ تا ۲۰ میلی گرم از بافت را توسط سونیکاتور و یا هموژنایزر در بافر PBS (یا بافر جایگزین) لیز کرده و سپس در 12000 rpm به مدت ۱۵ دقیقه در ۴ درجه سانتریفیوژ کنید . سوپرناتانت را در تیوب جدید در دمای -۸۰ فریز کنید.
****نکته: نمونه های با پروتئین بالا مانند کبد و سرم را ابتدا ۵ تا ۱۰ برابر با آب دیونیزه رقیق کنید و در نهایت ضریب رقت را اعمال کنید.**

سلول های چسبنده

محیط را خالی و سپس سلول ها را تریپسینه کرده و پس از سانتریفیوژ کردن سوپرناتانت را دور ریخته و در بافر PBS تا ۳ بار فریز و دفریز نمایید تا سلول ها لیز شوند.

سلول های معلق

پس از سانتریفیوژ کردن سوپرناتانت را دور ریخته و در بافر PBS تا ۳ بار فریز و دفریز کرده تا سلول ها لیز شوند.

نمونه سرم

خون را در تیوب بدون ضد انعقاد ریخته و به مدت ۳۰ دقیقه در دمای اتاق گذاشته تا لخته شود.سپس در ۲۵۰۰×g به مدت ۲۰ دقیقه سانتریفیوژ کنید . سرم زرد رنگ را بدون آسپیره کردن لایه سفید بافی (لکوسیت) برداشته و تا زمان آزمایش در دمای -۸۰ فریز کنید.

****نکته: از نمونه همولیز پرهیز شود. نمونه هپارینه به EDTA ارجح تر می باشد.**

آماده سازی کیت و استاندارد

- پس از آماده سازی نمونه موارد زیر را آماده کنید. محلول ها تا یک ساعت پس از آماده سازی پایدار هستند. همه محلولها در دمای اتاق گرم شوند.
-تمام مواد کیت را قبل از شروع اسپین کنید تا محتویات از در و دیواره به ته ظرف جمع آوری شود.
*** محلول کاری TAC برای هر نمونه یا استاندارد:**

- 150 µL TAC Buffer
- 2 µL CU+2 Solution
- 2 uL Chromogen

آماده سازی استاندارد:

- به ویال Trolox مقدار 100 µL از TAC DMSO اضافه کنید و خوب مخلوط کرده تا پودر Trolox حل شود. سپس در دمای 20- °C در حجم های 25 µL تقسیم بندی نمایید. این محلول تا ۴ ماه قابل نگهداری می باشد.
- مقدار 25 µL از Trolox حل شده را با 975 µL از PBS مخلوط کنید تا استاندارد 1 mM حاصل شود. سپس آن را تقسیم بندی کرده و در دمای 20°C- به مدت ۴ ماه نگه دارید.
-با توجه به جدول زیر استانداردها را آماده سازید:

غلظت Trolox (nmol/mL)	محلول استاندارد 1 mM (µL)	PBS (µL)	حجم نهایی (µL)
۰	۰	۱۰۰	۱۰۰
۴۰	٤	۹٦	۱۰۰
۸۰	۸	۹۲	۱۰۰
۱٦۰	۱٦	۸٤	۱۰۰
۲۰۰	۲۰	۸۰	۱۰۰
۴۰۰	٤۰	٦۰	۱۰۰

نحوه انجام آزمایش

۱- ابتدا به هرچاهک 30 µL از نمونه و یا استاندارد اضافه کنید. توصیه می شود هر نمونه و یا استاندارد را به صورت دوتایی (Duplicate) انجام دهید.

۲- از PBS Buffer به عنوان بلانک استفاده کرده و 30 µL از این محلول را به چاهک بلانک اضافه نمایید.

۳- 150 uL از محلول کاری TAC را به هرچاهک اضافه کنید.

۴- پلیت را در دمای اتاق به مدت ۶۰-۳۰ دقیقه انکوبه کنید.

۵- در نهایت جذب پلیت را در طول موج ۴۵۰ نانومتر بخوانید.

۱- مقدار میانگین جذب بلانک را از نمونه ها و استاندارد کم کنید.

۲- با استفاده از یک نرم افزار مناسب مانند اکسل و با استفاده از جذب استانداردها منحنی استاندارد را رسم کنید و غلظت نمونه ها را حساب نمایید.

۳- در صورت رقیق نمودن نمونه در ابتدا، ضریب رقت را در عدد نهایی ضرب کنید.

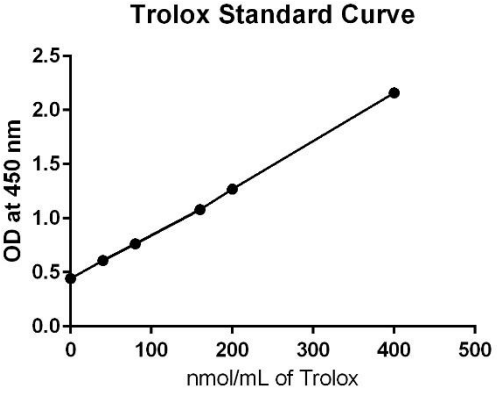
۴- نمونه ها بر حسب nmol of trolox equivalent/mL بیان می شوند.

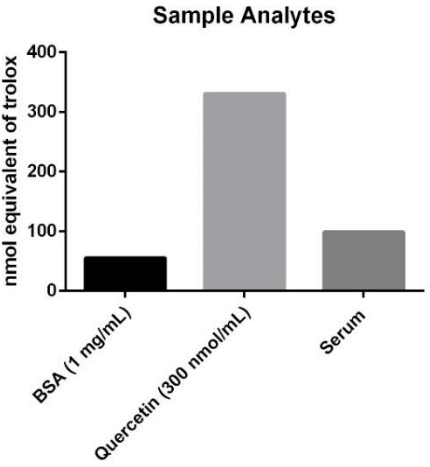
۵- جهت نرمال سازی مقادیر بهتر است میزان پروتئین نمونه ها قبل از آزمایش سنجیده شود و مقادیر برحسب میلی گرم پروتئین نرمال سازی شوند.

(nmol of trolox equivalent/mg Protein)

برای محاسبه خودکار از نرم افزار Curve expert نسخه Basic نیز می توانید محاسبه را انجام دهید

https://www.curveexpert.net/

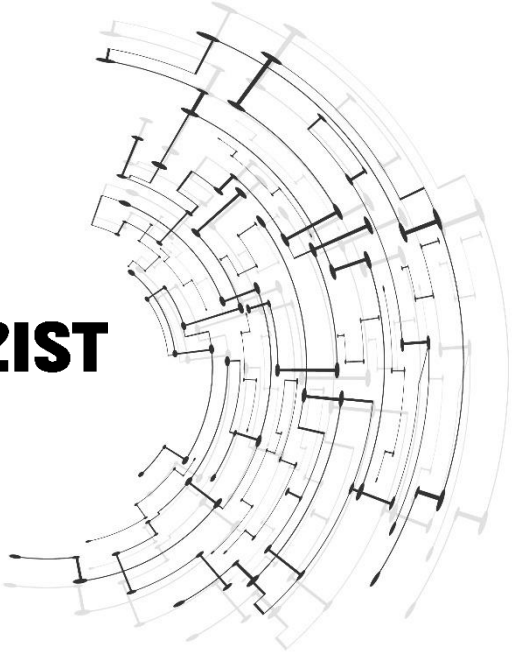

Trolox Standard Curve
OD at 450 nm
2.5
2.0
1.5
1.0
0.5
0.0
0
100
200
300
400
500
nmol/mL of Trolox


Sample Analytes
nmol equivalent of trolox
400
300
200
100
0
BSA (1 mg/mL)
Quercetin (300 nmol/mL)
Serum

مشکل یابی

مشکل	علت	راه حل
جذب بالای منحنی استاندارد	مقدار نمونه اولیه بالا نمونه با پروتئین بالا	مقدار نمونه اولیه را کم کنید - -رقیق سازی نمونه در PBS Buffer
جذب پایین منحنی استاندارد	-مقدار نمونه اولیه کم -خراب شدن بافر Chromogen	-مقدار نمونه را افزایش دهید -بافر Chromogen را تازه آماده کنید
کدورت چاهک	غلظت بالای پروتئین نمونه یا سرم	توسط روش پرکلریک اسید پروتئین حذف شود

KIAZIST



www.Kiazist.com

081-3450 8267
0930 402 4884

Info@Kiazist.com