KIAZIST Life Sciences

کیت اندازه گیری
وضعیت تام اکسیدانی (TOS)
KTOS-96
جهت سنجش ۹۶ نمونه

اصول کار

میزان آنتی اکسیدان ها و اکسیدان های بدن در شرایط بیماری (پاتولوژیک) دچار تغییرات گسترده ای می شود. وضعیت تام اکسیدانی (TOS) اشاره به میزان کلی اکسیدان های نمونه دارد که می تواند شامل گونه های آزاد اکسیژن (ROS) و یا نیتروژن (RNS) باشد.

در این آزمایش فرو (Fe^{+2}) در حضور اکسیدان ها به فریک (Fe^{+3}) اکسید می شود و در حضور کروموژن تولید رنگ می کند. این رنگ در طول موج ۵۵۰-۵۸۰ دارای است.

میزان جذب با مقدار اکسیدان رابطه مستقیم دارد و منحنی استاندارد در حضور H_2O_2 رسم می شود.

نگهداری و حمل:
در دمای ٤ درجه سانتیگراد نگهداری شود. حمل توسط یخ مرطوب انجام می شود.
محدوده اندازه گیری دینامیک: 1.5-12.5 nmol/mL
حساسیت: 0.7 nmol/mL H_2O_2 Equivalent

مقدار نمونه پیشنهادی

نمونه	حداکثر	مطلوب
Tissues from animal/plant	30 mg	20 mg
Cells	1.5×10^7	5×10^6 –1×10^7
Serum	40 µl	30 µl

محتویات کیت

شماره	ماده	مقدار/تعداد
1	TOS Buffer	20 ml
2	Developer	200 µL
3	H_2O_2 Standard (9.78 M)	50 µL
4	96-well Clean photometric Plate	1 PCs

موارد مورد نیاز اضافی

- ست سمپلر متغیر
- سرسمپلر مناسب
- لوله تمیز ۱۰ میلی لیتری
- میکروتیوب ۱/۵ میلی لیتری
- سانتریفیوژ دور بالا (12000 RPM)
- آب دیونیزه
- دستگاه Plate Reader دارای طول موج ۵۸۰-۵۴۰ نانومتر
- بافر PBS

نکته: قبل از شروع، آزمایش توسط تعدادی نمونه جهت مشخص ساختن فعالیت آنزیم به صورت پایلت (Pilot) به همراه استاندارد انجام شود.

***قبل از انجام تست کل پروتکل را به دقت بخوانید.**

آماده سازی نمونه

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 و در دمای -۸۰ فریز کنید.

سلول های چسبنده

محیط را خالی و سپس سلول ها را تریپسینه کرده و پس از سانتریفیوژ کردن سوپرناتانت را دور ریخته و سلول ها را 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 سلول ها را 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 قرار داده تا لخته شود.سپس در 2500×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 شده پرهیز شود. نمونه هپارینه نسبت به نمونه حاوی EDTA ارجح می باشد.**

آماده سازی کیت

- پس از آماده سازی نمونه موارد زیر را آماده کنید. همه محلول ها در دمای اتاق گرم شوند.

-تمام مواد کیت را قبل از شروع اسپین کنید تا محتویات از در و دیواره تیوب ها به ته ظرف جمع آوری شود.

- در صورت مشاهده رسوب در محلول ها، با تکان دادن ظرف رسوب ها را حل نمایید.

محلول کاری: در یک تیوب تمیز به ازای هر نمونه ۲۰۰ میکرولیتر از TOS Buffer را با 2 µl از محلول Developer و به خوبی کنید.

پس از آماده سازی مخلوط فوق، در بازه زمانی ۱۰ دقیقه آن را مصرف کنید تا حساسیت اندازه گیری کاهش نیابد. از این رو توصیه می شود پس از اضافه کردن نمونه ها و استاندارد به چاهک ها، این محلول کاری را آماده سازید.

آماده سازی استاندارد

آماده سازی استاندارد:

- در یک تیوب تمیز 10.2 µl از ویال استاندارد را با ۱۰ میلی لیتر آب دیونیزه مخلوط کنید تا استاندارد 10 mM ساخته شود.

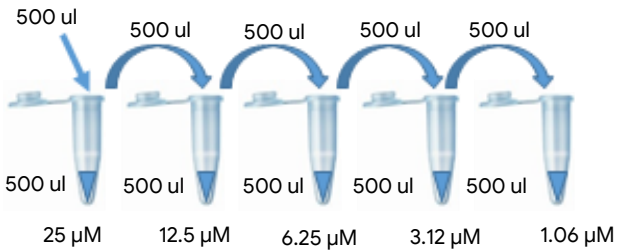
- سپس به یک میکروتیوب 1000 µl آب دیونیزه اضافه کرده و 5 µL از آن را دور بریزید و بجای آن 5 uL از محلول 10 mM را به آن اضافه کرده تا استاندارد 50 µM H_2O_2 ساخته شود.

-به پنج میکروتیوب 500 uL آب دیونیزه اضافه کرده و سپس از غلظت 50 µM به میزان 500 uL به میکروتیوب اول اضافه کرده و خوب مخلوط کنید.

مطابق شکل زیر Serial Dilution تهیه شود.

نکته: نیاز به انجام استاندارد ۲۵ میکرومولار نمی باشد.

استاندارد ها: 12.5-6.25-3.12-1.06



نحوه انجام آزمایش

۱- به هرچاهک ۵۰ میکرولیتر از نمونه و یا استاندارد اضافه کنید. توصیه می شود هر نمونه و یا استاندارد را به صورت دوتایی (Duplicate) انجام دهید.

۲- از بافر PBS به عنوان بلانک استفاده کنید.

۳- از محلول کاری ۲۰۰ میکرولیتر به هرچاهک اضافه کنید.

۴- در دمای اتاق به مدت ۱۰ تا ۲۰ دقیقه انکوبه کنید و سپس جذب را در ۵۶۰ نانومتر خوانده و یادداشت کنید.

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

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

۳- سپس از فرمول زیر ضریب رقت را اعمال نمایید:

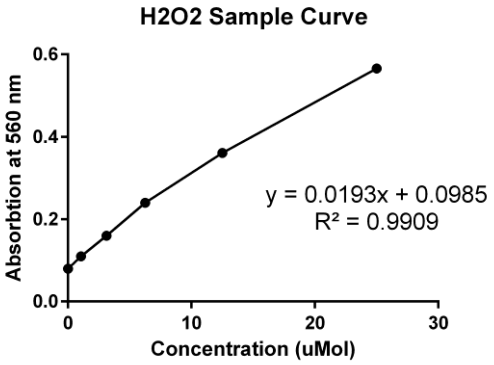
H_2O_2 Equivalent (µM or nmol/mL) = A × ضریب رقت

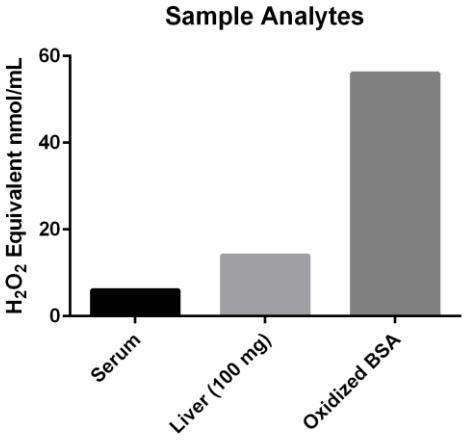
A= مقدار محاسبه شده از منحنی استاندارد

۴- جهت نرمال سازی مقادیر بهتر است میزان پروتئین نمونه ها سنجیده شود و مقادیر برحسب میلی گرم پروتئین نرمال سازی شوند. در این صورت واحد اندازه گیری به صورت nmol/mg protein می باشد.

برای محاسبه خودکار از نرم افزار Curve expert نسخه Basic نیز می توانید استفاده کنید.

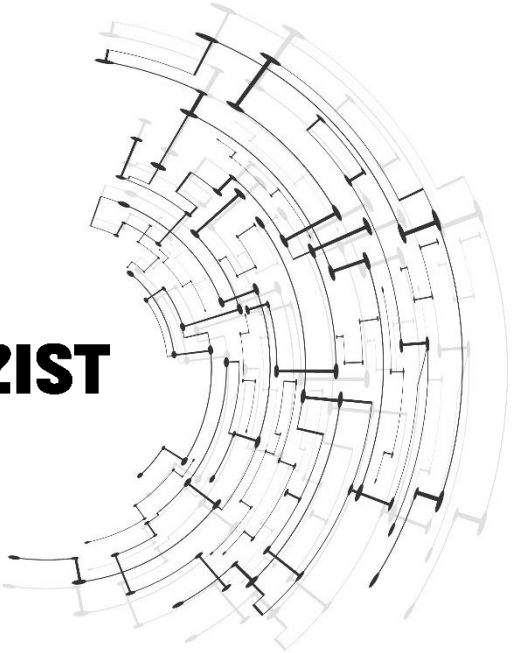
https://www.curveexpert.net/


H2O2 Sample Curve
Absorbtion at 560 nm
0.6
0.4
0.2
0.0
0
10
20
30
Concentration (uMol)
y = 0.0193x + 0.0985
R² = 0.9909


Sample Analytes
H2O2 Equivalent nmol/mL
60
40
20
0
Serum
Liver (100 mg)
Oxidized BSA

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 -کمبود زمان انکوباسیون	-مقدار نمونه را افزایش دهید -بافر Chromogen را به صورت تازه آماده کنید -زمان انکوباسیون را تا ۶۰ دقیقه افزایش دهید.
چاهک های سبز رنگ	-همولیز بالا -مقدار بالای آهن در نمونه	-نمونه ها را رقیق کنید



KIAZIST

www.Kiazist.com

081-3450 8267
0930 402 4884

Info@Kiazist.com