KIAZIST Life Sciences

کیت اندازه گیری ویتامین C

Vitamin C (Ascorbic Acid) Assay Kit

KVC96

اصول کار

ویتامین C یا اسکوربیک اسید از مجموعه ویتامین های اساسی در پستانداران و برخی پرندگان می باشد که قادر به ساخت آن نیستند. گیاهان منبع سرشاری از این ویتامین هستند. این ویتامین که به خواص آنتی اکسیدانی خود معروف می باشد اعمال گسترده ای را در بدن به عهده دارد. به عنوان مثال در واکنش های هیدروکسیلاسیون (مانند ساخت کلاژن و یا نوراپی نفرین) مورد نیاز است.

در این کیت ویتامین C ابتدا اکسیده شده سپس با کروموژن مخصوص واکنش داده تا در طول موج ۵۳۰ نانومتر جذب داشته باشد. بافر لیز ویژه در این کیت منجر به حفظ ویتامین C شده که برای ذخیره بلند مدت آن مناسب می باشد.

اطلاعات کلی و محتویات

نگهداری و حمل:

در دمای 4 ˚C نگهداری شود. حمل توسط یخ مرطوب انجام می شود.

محدوده دینامیک: 5-40 µg/mL

حساسیت: 2 µg/mL

مقدار نمونه پیشنهادی

نمونه	حداکثر	مطلوب
Cells	1.5×10^6	5×10^5 –1×10^6
Tissue	100 mg	50 mg
Plasma or Serum	200 uL	200 uL
Plant	500 mg	50-500 mg

محتویات کیت

شماره	ماده	مقدار/تعداد
۱	Oxidizing Agent	1.5 mL
۲	Lysis Buffer	50 mL
۳	Develop Agent	10 mL
۴	Chromogen	2 mL
۵	Vitamin C Standard	Powder
۶	96-well Photometric Plate	1 PCs
۷	Protocol Booklet	1 PCs

موارد مورد نیاز اضافی

- سرسمپلر و سمپلر در اندازه های مختلف
- میکروتیوب ۱/۵ میلی لیتری
- سولفوریک اسید (Sulfuric Acid)
- آب دیونیزه یا مقطر
- فور یا بن ماری با دمای 37 °C
- شیکر (Shaker)
- سانتریفیوژ دوربالا (15000×g)
- دستگاه Plate Reader با طول موج ۵۰۰-۵۳۰ نانومتر
- کیت اندازه گیری پروتئین برای نرمال سازی (انتخابی)- KBCA96 Kiazist

*قبل از انجام تست کل پروتکل را بخوانید.

* حتما مطالعه پایلوت قبل از تست اصلی جهت ستاپ نمونه انجام شود.

آماده سازی نمونه سلول و بافت (حیوانی و گیاهی)

سلول: از Lysis Buffer به میزان ۱ میلی لیتر روی سلول ها ریخته سپس آنها را با اسکراپر بتراشید.

بافت حیوانی: ۱۰۰ میلی گرم از بافت حیوانی را در ۵۰۰ میکرولیتر از Lysis Buffer کاملا هموژن کنید.

بافت گیاهی: ۳۰۰ میلی گرم از بافت گیاهی را در ۵۰۰ میکرولیتر از Lysis Buffer کاملا هموژن کنید.

در ادامه به مدت ۱۰ دقیقه در 15000×G سانتریفیوژ کرده و سوپرناتانت را جمع آموری کنید. سپس در ۴۰۰ میکرولیتر از آن را به یک میکروتیوب جدید انتقال داده و به آن ۲۰ میکرولیتر سولفوریک اسید غلیظ اضافه کرده و خوب مخلوط کنید. سپس به مدت ۱۰ دقیقه در 15000×G سانتریفیوژ کرده و سوپرناتانت را جمع آموری کنید. در این مرحله می توانید آن را در دمای 20- °C ذخیره کرده و یا مستقیم به مرحله آزمایش ببرید.

آماده سازی مایعات بیولوژیک (سرم، پلاسما و .....)

ابتدا ۲۰۰ میکرولیتر از نمونه را با ۲۰۰ میکرولیتر Lysis Buffer ترکیب کنید. در ادامه به آن ۲۰ میکرولیتر سولفوریک اسید غلیظ اضافه کرده و خوب مخلوط کنید. سپس به مدت ۱۰ دقیقه در 15000×G سانتریفیوژ کرده و سوپرناتانت را جمع آموری کنید. در این مرحله می توانید آن را در دمای 20- °C ذخیره کرده و یا مستقیم به مرحله آزمایش ببرید.

- پس از آماده سازی نمونه موارد زیر را آماده کنید.
- همه محلول ها در دمای اتاق گرم شوند.
- تمامی تیوب ها اسپین شوند تا محتویات به ته ویال ها جمع شود.

❖ تمامی محلول ها آماده به مصرف می باشند.

❖ Develop Agent: این محلول به طور طبیعی رسوب می کند. قبل از استفاده تکان دهید. نیاز به حل شدن ندارد.

❖ اسید سولفوریک ۸۵٪: ۸/۵ میلی لیتر از اسید سولفوریک غلیظ را با ۱/۵ میلی لیتر آب دیونیزه مخلوط کنید.

آماده سازی استاندارد:

به ویال استاندارد یک میلی لیتر از Lysis Buffer اضافه کرده و طبق جدول زیر استانداردها را بسازید. این ویال تا ۱ ماه در دمای ˚C 20- قابل نگهداری می باشد.

شماره استاندارد	Lysis Buffer (uL)	استاندارد استوک (uL)	غلظت نهایی (µg/mL)
A	۱۰۰۰	۰	۰
B	۹۹۵	۵	۵
C	۹۹۰	۱۰	۱۰
D	۹۸۰	۲۰	۲۰
E	۹۶۰	۴۰	۴۰

نحوه انجام آزمایش

- جهت دقت آزمایش و محاسبه Technical Replication توصیه می شود هر نمونه و یا استاندارد به صورت دوتایی انجام شود. نمونه ها در طول آزمایش بر روی یخ نگهداری شوند.

۱. در یک تیوب جدید ۲۰۰ میکرولیتر از نمونه آماده شده و استانداردها را با ۱۲ میکرولیتر از Oxidizing Agent ترکیب کرده و در دمای اتاق به مدت ۵ دقیقه انکوبه کنید.

۲. در ادامه ۷۰ میکرولیتر از Develop Agent را با آن ترکیب کرده و خوب هم بزنید. سپس به مدت یک دقیقه در 15000×g سانتریفیوژ کنید.

۳. سپس ۱۳۰ میکرولیتر از سوپرناتانت را برداشته و به پلیت ۹۶ خانه اضافه کنید.

۴. در ادامه به هر چاهک ۲۰ میکرولیتر Chromogen اضافه کرده و پلیت را به آرامی تکان داده تا مخلوط شود. سپس روی پلیت را پوشانده و در دمای 37 °C به مدت ۴ تا ۵ ساعت انکوبه کنید.

۵. در پایان این زمان، به هر چاهک ۱۰۰ میکرولیتر اسید سولفوریک ۸۵٪ اضافه کرده و به مدت ۵ دقیقه بر روی شیکر قرار دهید تا دانه های قرمز در هر چاهک حل شود.

۶. در آخر جذب پلیت را در طیف ۵۰۰ تا ۵۴۰ نانومتر خوانش کنید.

۱. ابتدا از چاهک های دوتایی میانگین بگیرید.

۲. سپس جذب همه چاهک ها را از جذب استاندارد صفر (A) کم کنید.

۳. در ادامه توسط جذب استانداردها منحنی استاندارد در برابر غلظت استانداردها را رسم کنید. (نرم افزار Excel یا Curve Expert).

۴. سپس بر طبق فرمول زیر غلظت منحنی را حساب کنید.

Ascorbic Acid Concentration (µg/mL) = C × D × 2

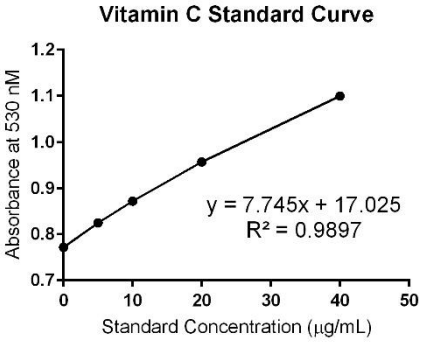
C= غلظت محاسبه شده نمونه از روی منحنی استاندارد

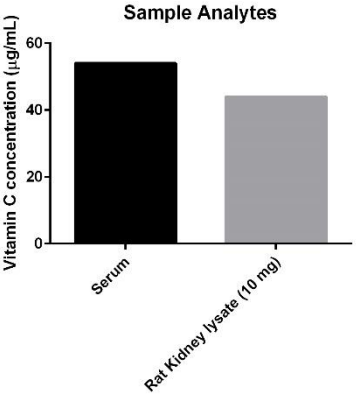
D= ضریب رقت نمونه

2= ضریب رقت که فقط برای مایعات بیولوژیک اعمال می شود

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

https://www.curveexpert.net/

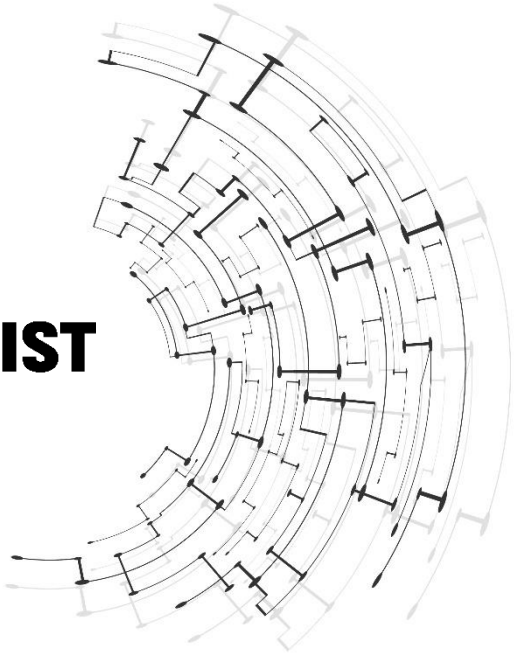

Vitamin C Standard Curve
Absorbance at 530 nM
1.2
1.1
1.0
0.9
0.8
0.7
y = 7.745x + 17.025
R² = 0.9897
0
10
20
30
40
50
Standard Concentration (µg/mL)


Sample Analytes
Vitamin C concentration (µg/mL)
60
40
20
0
Serum
Rat Kidney lysate (10 mg)

مشکل یابی

مشکل	دلیل	راه حل
آزمایش کار نمیکنه!	بافرها در دمای نامناسب می باشند	مراجعه شود به بخش آماده سازی کیت
	مرحله ای از پروتکل جا افتاده است	مجددا پروتکل را مطالعه نمایید
	طول موج اشتباه	حتما در طیف توصیه شده پلیت را بخوانید
نتایج غیر قابل انتظار	طول موج اشتباه	حتما در طیف توصیه شده پلیت را بخوانید
	نمونه دارای ذرات نامحلول می باشد	حتما مرحله حذف پروتئین با H_2SO_4 انجام شود
	جذب نمونه ها از خارج از طیف استاندارد می باشد	با رقیق کردن نمونه و یا تهیه نمونه غلیظ انجام دهید
استاندارد خطی نیست	محتویات کیت به طور کامل به دمای ذکر شده نرسیده اند	از به دما رسیدن و یک دست بودن مواد مطمئن شوید (بافر ماسک گرم شود)
	خطای پیپت کردن	از دقت سمپلرها مطمئن شوید
	وجود حباب در چاهک ها	پیپتاژ کردن شدید تولید حباب می کند

KIAZIST



www.Kiazist.com

081-3450 8267
0930 402 4884

Info@Kiazist.com