کیت اندازه گیری روی

Zinc Assay Kit

KZN96

اصول کار

روی با عدد اتمی ۳۰ شباهت زیادی به منیزیوم دارد و یک فلز کمیاب اساسی برای بدن می باشد که نقش های گسترده ای در موجودات زنده ایفا می کند. روی در عملکرد بیش از ۳۰۰ آنزیم در بدن نقش دارد. همچنین نقش آن در عملکرد سیستم ایمنی (پروستات) و هموستاز خون به خوبی شناخته شده است.

در این کیت می توان تمام مایعات حاوی روی را با حداقل نمونه مورد آزمایش قرار داد و با حساسیت بالا کمترین میزان روی را اندازه گیری کرد. همچنین به دلیل تداخل منیزیوم با روی، محلول ماسکه کننده منیزیوم در این کیت منجر به از بین رفتن تداخل می شود. دقت این کیت نزدیک به اندازه گیری با روش جذب اتمی می باشد.

درنهایت جذب در طول موج ۵۳۰-۵۷۰ نانومتر به روش کالریمتری قابل خوانش می باشد که با کمترین میزان نمونه نیز سازگاری دارد.

اطلاعات کلی و محتویات

نگهداری و حمل:

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

محدوده دینامیک: 5-40 µM or nmol/mL

حساسیت: 3 µM or nmol/mL

مقدار نمونه پیشنهادی

نمونه	حداکثر	مطلوب
Cells	1.5×10^6	5×10^5 –1×10^6
Tissue	10 mg	1-2 mg
Plasma or Serum	10 uL	10 uL
Plant	10 mg	5 mg

محتویات کیت

شماره	ماده	مقدار/تعداد
۱	Buffer Reagent 10X	3 mL
۲	Mask Reagent	20 mL
۳	Zinc Chromogen	650 µL
۴	Zinc Standard (10 mM)	1 mL
۵	TCA 7%	10 mL
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
- HCl (اسیدکلریدریک) برای شستشوی ظروف و نمونه ادرار
- آب دیونیزه یا مقطر
- شیکر (Shaker)
- سانتریفیوژ دوربالا (15000×g)
- دستگاه Plate Reader با طول موج ۵۳۰-۵۷۰ نانومتر

*قبل از انجام تست کل پروتکل را بخوانید.

نکات عمومی

- پلاستیک های صناعی و شیشه های آزمایشگاهی عمدتا دارای روی هستند. قبل از شروع آزمایش با اسید کلریدریک رقیق شده باید شسته شوند سپس آبکشی و خشک شوند تا از تداخل با نمونه جلوگیری شود.
- شلاتورهایی مانند EDTA و EGTA پیوند ضعیفی با روی برقرار می کنند بنابراین در آماده سازی نمونه و بافر لیز کننده باید پرهیز شوند.
- لوله های مناسب برای پلاسما نباید حاوی EDTA به عنوان ضد انعقاد باشند.
- بیشتر روی خون (۸۰٪) در گلبول های قرمز می باشد بنابراین نمونه همولیز شده برای انجام آزمایش قابل قبول نمی باشد.

آماده سازی نمونه سلول و بافت

سلول ها را برداشت کرده و یا بافت را هموژن کنید آنها را در بافر لیز کننده (هر نوع بافر لیز کننده بدون EDTA یا EGTA) لیز کنید تا محتویات آن آزاد شود. سپس در 15000×g سانتریفیوژ کنید. در ادامه در یک میکروتیوب جدید، 80 µL ازآن را با 80 µL از 7% TCA ترکیب کنید تا پروتئین رسوب کند. سپس در بالاترین سرعت سانتریفیوژ به مدت ۵ دقیقه سانتریفیوژ کنید. در ادامه 20-80 µL از سوپرناتانت را برداشته و به هرچاهک اضافه کنید. در صورتیکه کمتر از 80 µL از نمونه برداشت می شود با آب دیونیزه حجم باقیمانده را به 80 µL در هر چاهک برسانید.

نمونه ادرار

نمونه ادرار باید اسیدی شود (pH=3-4) تا رسوبات حل شده و از تداخل با روی جلوگیری شود. از اسید کلریدریک غلیظ یک تا دو قطره به هر 15 mL نمونه ادرار اضافه شود. سپس نمونه به طور مستقیم (20-80 µL/Well) در هر چاهک استفاده شود.

مایعات بیولوژیک شامل سرم، پلاسما، محیط کشت و .....)

80 µL از نمونه را با 80 µL از 7% TCA ترکیب کنید تا پروتئین رسوب کند. سپس در بالاترین سرعت سانتریفیوژ به مدت ۵ دقیقه سانتریفیوژ کنید. در ادامه 20-80 µL از سوپرناتانت را برداشته و به هرچاهک اضافه کنید. در صورتیکه کمتر از 80 µL از نمونه برداشت می شود با آب دیونیزه حجم باقیمانده را به 80 µL در هر چاهک برسانید.

انجام نمونه آزمایشی (Pilot Test) برای مشخص ساختن رقت مناسب در محدوده استاندارد قبل از آزمایش توصیه می شود.

آماده سازی کیت و استاندارد

- 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.

❖ Mask Reagent: این محلول در دمای 4 °C رسوب می کند. در دمای 37 °C گرم شود.

آماده سازی استاندارد:

ابتدا از ویال استوک (10 mM) به میزان 100 µL برداشته و با 900 µL آب مقطر یا دیونیزه مخلوط کنید تا استوک 1 mM آماده شود. سپس طبق جدول زیر جهت آماده سازی استانداردها عمل نمایید:

شماره استاندارد	آب دیونیزه (uL)	استاندارد 1 mM (uL)	غلظت نهایی (nmol/mL)
A	۱۰۰۰	۰	۰
B	۹۹۵	۵	۵
C	۹۹۰	۱۰	۱۰
D	۹۸۰	۲۰	۲۰
E	۹۶۰	۴۰	۴۰

-جهت دقت آزمایش و محاسبه Technical Replication توصیه می شود هر نمونه و یا استاندارد به صورت دوتایی انجام شود.

۱. به ازای هر واکنش یک MasterMix+ یک Waste بسازید.

MasterMix	
۲۰ میکرولیتر	Buffer Reagent 10X
۱۸۰ میکرولیتر	Mask Reagent
۴ میکرولیتر	Zinc Chromogen

به عنوان مثال برای ۹ واکنش و در نظر گرفتن یک عدد Waste مجموعا ۱۰ عدد در نظر می گیریم:

- Buffer Reagent 10X: 200 uL
- Mask Reagent: 1800 uL (1.8 mL)
- Zinc Chromogen: 40 uL

۲. سپس در هر چاهک ۸۰ میکرولیتر از نمونه، استاندارد و یا بلانک (بافر لیز کننده) ریخته و به آن ۲۰۰ میکرولیتر از MasterMix اضافه کرده و در دمای اتاق به مدت ۵ دقیقه انکوبه کنید.

۳. در پایان جذب تمامی چاهک ها را در 530-570 nM بخوانید.

نحوه محاسبه

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.

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

Zn Concentration (uM or nmol/mL)= $\frac{C}{V} \times D$

C= غلظت محاسبه شده نمونه از روی منحنی استاندارد

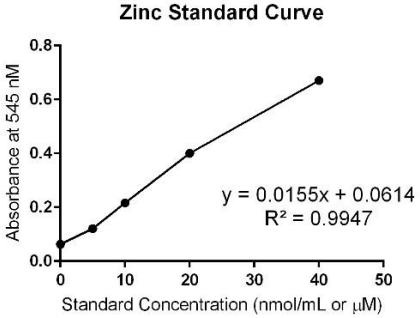
V=حجم ریخته شده هر نمونه در هر چاهک

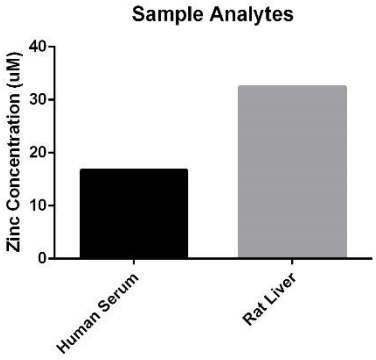
D= ضریب رقت نمونه

Zn Molecular Weight= 65.384 g/mol

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

https://www.curveexpert.net/


Zinc Standard Curve
Absorbance at 545 nM
0.8
0.6
0.4
0.2
0.0
0
10
20
30
40
50
y = 0.0155x + 0.0614
R² = 0.9947
Standard Concentration (nmol/mL or μM)


Sample Analytes
Zinc Concentration (uM)
40
30
20
10
0
Human Serum
Rat Liver

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 درات نامحلول می باشد	حتما مرحله حذف پروتئین با TCA 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 همیشه MasterMix آماده کنید
	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