



کیت سنجش ظرفیت آنتی اکسیدانسی تام

Naxifer™ (Total Antioxidant Capacity Assay Kit)

V_0.5 Microplate reader

مقدمه:

تولید رادیکال آزاد و گونه‌های واکنش‌گر اکسیژن یکی از مسائل غیر قابل اجتناب در فرآیند متابولیسم محسوب می‌شود. شواهد بیوشیمیایی، زیستی و بالینی فراوان وجود دارد که نشان می‌دهد واکنش اکسایشی ناشی از رادیکال‌های آزاد که سایتوتوکسیک است، در ایجاد بیماری‌های مختلف همچون سرطان، دیابت، بیماری‌های قلبی و عروقی، آترواسکلروزیس و بیماری‌های عصبی، تسریع پیری و در فساد مواد غذایی دخالت دارد. در سال‌های اخیر به دلیل خاصیت آنتی اکسیدانسی در ممانعت از اثرات رادیکال آزاد در ایجاد بیماری‌ها و فساد مواد غذایی، نقش و اثر آنتی اکسیدانسی‌ها مورد توجه محققین، پزشکان و عموم مردم قرار گرفته است و مطالعات ارزیابی ظرفیت آنتی اکسیدانسی یکی از متداول‌ترین موضوعات مورد بررسی در تحقیقات علوم زیستی و پزشکی بوده است.

کیت Naxifer™، ظرفیت آنتی اکسیدانسی بیومولکول‌ها را، در نمونه‌های مختلف، بر اساس توانایی احیاءکنندگی آهن دو ظرفیتی (FRAP) و با مکانیسم انتقال تک الکترون اندازه‌گیری می‌کند. تغییر رنگ حاصل از واکنش در طول موج 593 نانومتر توسط میکروپلیت ریدر اندازه‌گیری شده و برای به دست آوردن مقدار کمی ظرفیت آنتی اکسیدانسی باید از استاندارد و نمودار حاصل از آن استفاده شود. کیت Naxifer™ روشی سریع، ارزان و قابل دسترس برای اندازه‌گیری ظرفیت آنتی اکسیدانسی تام در نمونه‌های مختلف که شامل سرم، پلاسما، لیز سلول، ادرار، بافت هموژن شده، مواد غذایی و نوشیدنی‌ها در دسترس محققین است.

محتوای کیت:

1. Lysing Buffer: 50 میلی لیتر (کیت 48 تستی) / 50x2 میلی لیتر (کیت 96 تستی)
2. Reagent 1: 11 میلی لیتر (کیت 48 تستی) / 22 میلی لیتر (کیت 96 تستی)
3. Reagent 2a: 1 ویال
4. Reagent 2b: 2/2 میلی لیتر
5. Reagent 3: 1/1 میلی لیتر (کیت 48 تستی) / 2/2 میلی لیتر (کیت 96 تستی)
6. Standard Solution: 2 میلی لیتر

موارد مورد نیاز که در داخل کیت موجود نیست:

- فسفات بافر (برای نمونه های سلولی)
- متانول، کلروفرم و اتیلن استات (برای نمونه های گیاهی)

• فیلتر واتمن شماره یک (برای نمونه های گیاهی)

• هموژنایزر شیشه ای (هموژنایزر نوند سلامت با کد محصول 16010)

• تبخیرکننده (evaporator)

• سانتریفیوژ

• میکروپلیت ریدر با قابلیت خوانش 593 نانومتر

مراحل انجام آزمایش:

1) آماده سازی نمونه‌ها:

- **نمونه‌های بافتی:** برای لیز از Lysing Buffer استفاده شود، بدین صورت که از نمونه بافتی در حدود 50 تا 100 میلی گرم وزن کرده و 10 برابر وزن آن (500 تا 1000 میکرولیتر)، Lysing Buffer اضافه کنید. سپس توسط هموژنایزر شیشه‌ای (استفاده از هموژنایزر نوند سلامت با کد محصول 16010 پیشنهاد می‌گردد) نمونه مورد نظر را هموژنایز کرده و در 10000 دور به مدت 10 دقیقه سانتریفیوژ کنید (نوند سلامت در این مرحله استفاده از سانتریفیوژ یخچال‌دار را توصیه می‌کند). در ادامه مایع رویی را جدا کرده و به عنوان نمونه استفاده نمایید.

- **نمونه‌های سلولی:** تعداد 10^7 سلول را پس از شستشو با PBS با یک میلی لیتر Lysing Buffer هموژن کرده و پس از سانتریفیوژ در 10000 دور به مدت 10 دقیقه، مایع رویی را جدا کرده و به عنوان نمونه استفاده نمایید.

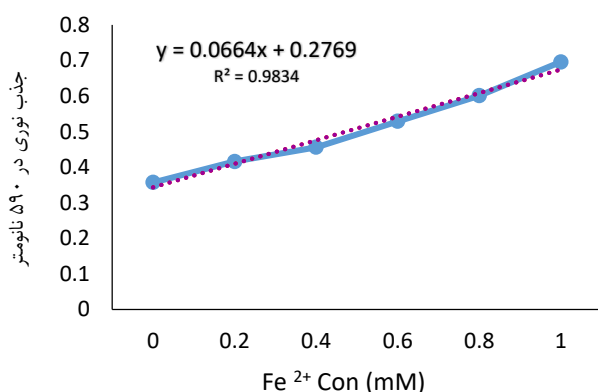
- **نمونه های بیولوژیکی شامل سرم، پلاسما و ادرار:** نیازی به آماده سازی ندارند. توجه داشته باشید در صورت استفاده از پلاسما نمونه نباید حاوی EDTA باشد.

- **آماده سازی نمونه های گیاهی:** پس از خشک کردن گیاه، میزان 1 گرم از گیاه مورد نظر را با استفاده از 100 میلی لیتر محلول متانول، کلروفرم و اتیلن استات هموژن کرده و اجازه دهید در همان محلول 24 تا 48 ساعت بماند. پس از طی این زمان محلول را با استفاده از فیلتر واتمن شماره 1 فیلتر کرده و پس از تبخیر محلول‌های مورد استفاده توسط تبخیرکننده (Evaporator)، می توانید از محلول باقیمانده به عنوان نمونه استفاده کنید.



میانگین نمونه‌ها را برای نمودار لحاظ کنید) و در ادامه به همه خانه‌های حاوی نمونه و یا استاندارد، ۲۵۰ میکرولیتر از محلول کار آماده شده را اضافه کنید و جذب نوری نمونه‌ها را پس از ۵ دقیقه در طول موج ۵۹۳ (۵۴۰ یا ۶۰۰) نانومتر قرائت کنید.

(5) رسم منحنی:



با استفاده از نرم‌افزارهای آماری همچون اکسل، نمودار منحنی استاندارد با غلظت‌های مختلف را به دست آورده و با توجه به فرمول خط ظرفیت آنتی‌اکسیدانتی تام را محاسبه نمایید.

فرمول خط حاصل از غلظت‌های مختلف استاندارد به صورت زیر خواهد بود:

$$y = Ax + B$$

y : جذب نوری استاندارد

A : شیب خط (مثال در فرمول خط بالا: 0/0664 می‌باشد)

x : غلظت استاندارد (Fe^{2+})

B : عرض از مبدا (مثال در فرمول خط بالا: 0/2769 می‌باشد)

واحد ظرفیت آنتی‌اکسیدانتی تام: $mmol Fe^{2+}/L$

*برای راحتی کار می‌توانید از محاسبه‌گر آنلاین که در صفحه

اینترنتی navandsalamat.com وجود دارد، استفاده نمایید.

(2) آماده سازی محلول کار:

نکته: نیم ساعت قبل از شروع آزمایش معرف‌ها را به دمای اتاق (20 تا 24 درجه سانتیگراد) رسانده و در صورت مشاهده کریستال، به‌وسیله ورتکس محلول را همگن کنید.

مرحله ۱: مقدار 2/2 میلی‌لیتر از معرف R2b را به هر بطری R2a اضافه کرده و تا حل شدن کامل پودر داخل R2a، کاملاً ورتکس کنید. پس از حل شدن کامل پودر، محلول R2 آماده است. ماندگاری محلول R2 در دمای یخچال ۱۴ روز است.

مرحله ۲: در ابتدا معرف R2 آماده شده را به نسبت ۱:۱ با معرف R3 مخلوط و پس از ورتکس، ۵ برابر حجم آن محلول R1 را اضافه کنید. محلول نهایی به‌عنوان محلول کار استفاده خواهد شد. ماندگاری محلول کار در یخچال ۲۴ ساعت است.

*نسبت‌های مورد استفاده بدین صورت خواهد بود:

$$(R_2 \ 1 \ cc + R_3 \ 1 \ cc) + R_1 \ 10 \ cc$$

(3) آماده سازی استاندارد:

استاندارد موجود در کیت (10 میلی‌مولار) را در موقع استفاده با نسبت ۱ به ۱۰ با آب مقطر دیونیزه رقیق کرده (یک میلی‌لیتر از استاندارد را با ۹ میلی‌لیتر آب مقطر) تا غلظت ۱ میلی‌مول از استاندارد به دست آید. سپس رقت‌های مختلف را با استفاده از جدول زیر تهیه کرده و برای رسم منحنی استاندارد از آن استفاده نمایید.

لوله (چاهک)	استاندارد ۱ میلی‌مولار (میکرولیتر)	آب مقطر (میکرولیتر)	غلظت نهایی استاندارد (mM)
A	۰	۱۰۰	۰
B	20	80	۰/2
C	40	60	۰/4
D	60	40	۰/6
E	80	20	۰/8
F	100	0	1

(4) روش کار:

در ابتدا 5 میکرولیتر از نمونه/ استاندارد آماده شده را در چاهک‌های پلیت ۹۶ خانه بریزید (از هر نمونه دو تکرار انجام داده و در آخر



عیب یابی

مشکل	احتمالات موجود	راه حل های پیشنهادی
عدم کارکرد سنجش یا آزمایش	سرد بودن بافر آزمایش	دمای بافر باید به دمای اتاق رسیده باشد
	عدم رعایت ترتیب مراحل آزمایش	به پروتکل موجود مراجعه کرده و دقیقاً پیروی نمایید
	پلیت ریدر در طول موج نادرست	تنظیمات فیلتر دستگاه را چک نمایید
	حضور بیلی روبین در واکنش	حذف بیلی روبین از نمونه های سنجش
	واکنش TPTZ با محلول های پلی فنولی مانند کافئیک اسید، فرولیک اسید و تانیک اسید	رعایت زمان خوانش و زمان سنجش
نمونه ها با قرائت (خوانش) نامنظم یا نامعقول	نمونه ها در بافرهای متفاوتی تهیه شده باشند	از بافر موحود در کیت استفاده نموده و یا به دستورالعمل موجود در پروتکل مراجعه نمایید
	نمونه های کشت بافت/سلول به صورت کامل هموژن نشده باشند	هموژن کردن نمونه را تکرار نمایید. مدت زمان مرحله ی همگن سازی را افزایش دهید
	استفاده از نمونه های چند بار دفریز شده	اگر نمونه ها چندین بار مورد استفاده قرار خواهند گرفت آن های را به دو یا سه قسمت تقسیم نمایید
	وجود ماده ی مداخله گر در نمونه	در صورت امکان نمونه را بیشتر رقیق نمایید
	استفاده از نمونه های قدیمی یا نامناسب	از نمونه های تازه استفاده کرده و تا زمان استفاده به درستی نگهداری شود
خوانش بالا / پایین در نمونه ها و استانداردها	دمای نامناسب ترکیبات	اجازه دهید تمام ترکیبات به دمای اتاق رسیده، سپس به آرامی ترکیب نمایید
	استفاده از کیت منقضی شده و یا نگهداری نامناسب معرف ها	تاریخ انقضای کیت را چک نموده و معرف ها را در شرایط مناسب نگهداری نمایید
	قرار گرفتن طولانی مدت معرف ها در معرض یخ	قبل از استفاده محلول واکنش تازه آماده کنید
	زمان و درجه حرارت نامناسب انکوباسیون	به پروتکل مراجعه کنید و زمان و دمای مناسب انکوباسیون را بررسی نمایید
	استفاده از حجم های نامناسب	از سمپلر کالیبره شده استفاده نموده و مواد را تقسیم نمایید
منحنی استاندارد غیر خطی	استفاده از ترکیبات نیمه گرم شده	قبل از آماده سازی محلول واکنش، همه اجزاء را به دمای مناسب رسانده سپس دوباره ترکیب نمایید
	خطاهای مرتبط با پیپت کردن در آماده سازی محلول های استاندارد	از حجم های بالا استفاده نمایید
	خطاهای پیپت کردن در محلول واکنش	محلول کار را هر زمان که ممکن است حاضر نمایید
	تشکیل حباب های هوا در چاهک ها	محتویات پیپت را به آرامی در چاهک ها خالی نمایید
	غلظت محلول استاندارد نادرست است	به دستورالعمل استاندارد رقت در پروتکل مراجعه کنید
	خطاهای محاسبات	بعد مراجعه به پروتکل، محاسبات را دوباره انجام دهید
نتایج غیر منتظره	نمونه ها در طول موج نادرست خوانده شوند	تنظیمات فیلتر و دستگاه را بررسی نمایید



در صورت امکان نمونه را بیشتر رقیق نمایید	نمونه ها دارای محتویات مداخله گر باشند	
نمونه های غلیظ یا رقیق کرده تا خوانایی در محدوده خطی باشند	خواندن نمونه در بالا / زیر محدوده خطی	