کیت سنجش ظرفیت آنتی اکسیدانتی تام
Naxifer™ Total Antioxidant Capacity (TAC) Assay Kit

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 موادغذایی دخالت دارد. در سال‌های اخیر به دلیل خاصیت آنتی‌اکسیدانت‌ها در ممانعت از اثرات رادیکال آزاد در ایجاد بیماری‌ها و فساد مواد غذایی، نقش و اثر آنتی‌اکسیدانت‌ها مورد توجه محققین، پزشکان و عموم مردم قرار گرفته است و مطالعات ارزیابی ظرفیت آنتی‌اکسیدانتی یکی از متداول‌ترین موضوعات مورد بررسی در تحقیقات علوم زیستی و پزشکی بوده است.

کیت **Naxifer™** ، ظرفیت آنتی‌اکسیدانتی بیومولکول‌ها را، در نمونه‌های مختلف، بر اساس روش FRAP و توانایی احیاءکنندگی آهن دو ظرفیتی و با مکانیسم انتقال تک الکترون اندازه‌گیری می‌کند. تغییر رنگ حاصل از واکنش در طول موج ۵۹۳ نانومتر توسط میکروپلیت ریدر اندازه‌گیری شده و برای به دست آوردن مقدار کمی ظرفیت آنتی‌اکسیدانتی باید از استاندارد و نمودار حاصل از آن استفاده شود. کیت **Naxifer™** روشی سریع، ارزان و قابل دسترس برای اندازه‌گیری ظرفیت آنتی‌اکسیدانتی تام در نمونه‌های مختلف که شامل سرم، پلاسما، لیز سلول، ادرار، بزاق، بافت هموژن شده، مواد غذایی و نوشیدنی‌ها در دسترس محققین است.

محتوای کیت:

ردیف	دمای نگهداری	نام ماده	۴۸ تست	۹۶ تست
۱	2-8 ºC	**Reagent 1**	۱۱ میلی‌لیتر	۲۲ میلی‌لیتر
۲	2-8 ºC	**Reagent 2a**	۱ ویال	۱ ویال
۳	2-8 ºC	**Reagent 2b**	۲/۲ میلی‌لیتر	۲/۲ میلی‌لیتر
۴	2-8 ºC	**Reagent 3**	۱/۱ میلی‌لیتر	۲/۲ میلی‌لیتر
۵	2-8 ºC	**Standard Solution**	۲ میلی‌لیتر	۲ میلی‌لیتر
۶	2-8 ºC	**Lysing Buffer**	۵۰ میلی‌لیتر	۱۰۰ میلی‌لیتر
۸	RT	**96-Well plate**	۱ عدد	۱ عدد

موارد مورد نیاز که در داخل کیت موجود نیست:

- فسفات بافر (برای نمونه‌های سلولی)
- متانول(برای نمونه‌های گیاهی)
- فیلتر واتمن شماره یک (برای نمونه‌های گیاهی)
- هموژنایزر، در صورت استفاده از بافت به عنوان نمونه (هموژنایزر دستی نوند سلامت با کد محصول ۱۶۰۱۰)
- سانتریفیوژ
- میکروپلیت ریدر با قابلیت خوانش ۵۹۳ نانومتر

Copyright © 2022 Navand Salamat. All rights reserved

مراحل انجام آزمایش:

۱) آماده‌سازی نمونه‌ها:

- **نمونه‌های بافتی:** برای لیز از **Lysing Buffer** استفاده شود، بدین صورت که از نمونه بافتی در حدود ۵۰ تا ۱۰۰ میلی‌گرم وزن کرده و ۱۰ برابر وزن آن (۵۰۰ تا ۱۰۰۰ میکرولیتر)، **Lysing Buffer** اضافه کنید. سپس توسط هموژنایزر شیشه‌ایی (استفاده از هموژنایزر نوند سلامت با کد محصول **۱۶۰۱۰** پیشنهاد می‌گردد) نمونه مورد نظر را هموژن کرده و در ۱۰۰۰۰ دور به مدت ۱۰ 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 نمائید.
- **نمونه‌های سلولی:** تعداد $۱۰^{۷}$ سلول را پس از شستشو با PBS با یک میلی‌لیتر **Lysing Buffer** هموژن کرده و پس از سانتریفیوژ در ۱۰۰۰۰ دور به مدت ۱۰ دقیقه، مایع رویی را جدا کرده و به عنوان نمونه استفاده نمائید.
- **نمونه‌های بیولوژیکی شامل سرم، پلاسما، بزاق و ادرار:** نیازی به آماده سازی ندارند. توجه داشته باشید در صورت استفاده از پلاسما نمونه نباید حاوی EDTA باشد.
- **آماده‌سازی نمونه‌های گیاهی:** پس از خشک کردن گیاه، میزان ۱ گرم از گیاه مورد نظر را با استفاده از ۱۰۰ میلی لیتر محلول متانول هموژن کرده و اجازه دهید در همان محلول ۶ ساعت بماند. پس از طی این زمان محلول را در ۶۰۰۰ دور به مدت ۱۰ دقیقه سانتریفیوژ کنید می‌توانید از محلول باقی‌مانده به عنوان نمونه استفاده کنید.
- **آماده‌سازی نمونه‌های غذایی:** مواد غذایی خام (مانند میوه ها یا سبزیجات) را در آب شستشو دهید و ۵ تا ۱۰ گرم (وزن مرطوب تازه) از آن را در ۱۰۰ میلی لیتر آب مقطر برای ۳۰ ثانیه هموژن کنید. هموژن حاصل را با استفاده از کاغذ صافی واتمن شماره ۱ فیلتر کرده و در در آب دوبارتقطیر (در صورت لزوم استون ۷۰٪ یا اتانول ۵۰٪) رقیق کنید.

۲) آماده سازی محلول کار:

نکته: نیم ساعت قبل از شروع آزمایش معرف‌ها را به دمای اتاق (۲۰ تا ۲۴ درجه سانتیگراد) رسانده و در صورت مشاهده کریستال، به‌وسیله ورتکس محلول را همگن کنید.

مرحله ۱: مقدار ۲/۲ میلی‌لیتر از معرف R2b را به هر بطری R2a اضافه کرده و تا حل شدن کامل پودر داخل R2a، کاملا ورتکس کنید. پس از حل شدن کامل پودر، محلول R2 آماده است. ماندگاری محلول R2 پس از آماده‌سازی 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 ۴۸ ساعت است.

* نسبت‌های مورد استفاده برای ۵۰ تست بدین صورت خواهد بود: $(R_2\ 1.1\ cc + R_3\ 1.1\ cc) + R_1\ 11\ cc$

۳) آماده سازی محلول استاندارد:

استاندارد موجود در کیت (۱۰ 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 نمائید.

لوله	استاندارد ۱ میلی‌مولار (میکرولیتر)	آب مقطر دیونیزه (میکرولیتر)	غلظت نهایی استاندارد (میلی‌مول)
A	۰	۱۰۰	۰
B	۲۰	۸۰	۰/۲
C	۴۰	۶۰	۰/۴
D	۶۰	۴۰	۰/۶
E	۸۰	۲۰	۰/۸
F	۱۰۰	۰	۱

Copyright © 2022 Navand Salamat. All rights reserved

۴) روش کار:

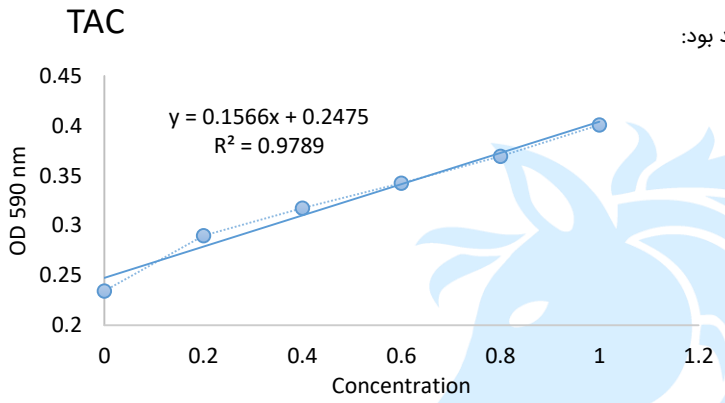
در ابتدا ۵ میکرولیتر از نمونه/ استاندارد آماده شده را در چاهک‌های پلیت ۹۶ خانه بریزید (توصیه می‌شود از هر نمونه دو تکرار انجام داده و در آخر میانگین نمونه‌ها را لحاظ کنید) و در ادامه به همه خانه‌های حاوی نمونه و یا استاندارد، ۲۵۰ میکرولیتر از محلول کار آماده شده را اضافه کرده و جذب نوری نمونه‌ها را پس از ۵ دقیقه در طول موج ۵۹۳ (ما بین ۵۷۰ با ۶۳۰) نانومتر قرائت کنید.

- در مورد نمونه‌های گیاهی زمان انکباسیون ۳۰ دقیقه در دمای بین ۳۵ تا ۵۰ درجه سانتیگراد می‌باشد.

۵) محاسبات:

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

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 نمودار مقابل این عدد برابر با ۰/۱۵۶۶ می‌باشد)

x: غلظت استاندارد (Fe^{2+})

B: عرض از مبدا (مثال در فرمول نمودار مقابل این عدد برابر با ۰/۲۴۷۵ می‌باشد)

واحد ظرفیت آنتی اکسیدانتی تام عبارت است از: **mmol Fe^{2+}/L**

۶) توصیه‌ها:

- محتویات کیت در یخچال (دمای ۲-۸ درجه سانتی‌گراد) نگهداری شود و نیم ساعت قبل از شروع آزمایش معرف‌ها را به دمای محیط (ترجیحاً دمای ۲۵ درجه سانتی‌گراد) برسانید.
- تمامی مواد را قبل از استفاده ورتکس نمایید به گونه‌ایی که هیچ کریستالی در معرف‌ها دیده نشود.
- ممکن است یک پژوهشگر نتایج متفاوت از آزمایش مشابه به دست بیاورد. به منظور بهتر شدن نتایج، توصیه می‌شود از هر نمونه و یا استاندارد دوبار تکرار انجام گرفته و میانگین آن‌ها را به عنوان نتیجه نهایی گزارش کنید.
- هرگونه تغییر در مخلوط کردن، زمان یا دمای انکوبه و زمان مصرف کیت نتایج مختلفی را ارائه خواهد داد لذا توصیه می‌شود در تغییر هر یک از پارامترها، منحنی استاندارد جدیدی رسم شود.
- در صورتی‌که مقدار جذب نمونه OD بیشتر از بالاترین مقدار استاندارد باشد، نمونه‌ها رقیق شده و مجددا سنجش انجام گیرد.
- قبل از شروع آزمایش، از کافی بودن مقدار نمونه‌ها اطمینان حاصل کنید.
- اگر ترکیبات فنولی و تیول در نمونه گیاهی مدنظر باشد به دلیل سرعت پائین واکنش در این ترکیبات با TPTZ این روش توصیه نمی‌شود.
- کیت‌های مختلف ممکن است حساسیت، محدوده تشخیص و روش کار متفاوتی داشته باشند، لذا آزمایش را دقیقا طبق روش کار مندرج در این پروتکل انجام دهید.
- محلول و مواد دیگر را جایگزین محلول و مواد و داخل کیت نکرده و تنها از مواد موجود در کیت استفاده کنید.
- پس از شروع آزمایش، تمام مراحل باید بدون وقفه کامل شود. اطمینان حاصل کنید که همه معرف‌ها، مواد و دستگاه‌ها در زمان مناسب آماده می‌شوند.
- زمان انکوباسیون نتایج را تحت تأثیر قرار خواهد داد لذا همه چاهک‌ها باید در همان ترتیب و زمان، مورد استفاده قرار گیرند.
- در زمان کار با کیت رعایت اصول ایمنی آزمایشگاهی الزامی می‌باشد.

Copyright © 2022 Navand Salamat. All rights reserved

۷) عیب‌یابی:

مشکل	احتمالات موجود	راه حل‌های 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 دقیقا پیروی نمایید
	حضور بیلی‌روبین در واکنش	حذف بیلی روبین از نمونه‌های سنجش
	پلیت ریدر در طول موج نادرست	تنظیمات فیلتر دستگاه را چک نمایید
	واکنش TPTZ با محلول های پلی فنولی مانند کافئیک اسید، فرولیک اسید و تانیک اسید	رعایت زمان خوانش و زمان سنجش
نمونه‌ها با قرائت (خوانش) نامنظم یا نامعقول	آماده‌سازی نمونه‌ها با بافر نادرست	از بافر موجود در کیت استفاده نموده و یا به دستورالعمل موجود در پروتکل مراجعه نمایید
	نمونه‌های کشت بافت/سلول به صورت کامل هموژن نشده	هموژن کردن نمونه را تکرار نموده و مدت زمان مرحله‌ی همگن‌سازی را افزایش دهید
	استفاده از نمونه‌های چند بار دفریز شده	اگر نمونه ها چندین بار مورد استفاده قرار خواهند گرفت نمونه‌ها را در هنگام نمونه‌برداری به دو یا سه قسمت تقسیم نموده و فریز نمایید
	وجود ماده‌ی مداخله‌گر در نمونه	در صورت امکان نمونه را بیشتر رقیق نمایید
	استفاده از نمونه‌های قدیمی یا نامناسب	ترجیحا از نمونه‌های تازه استفاده کنید
خوانش بالا و یا پایین در نمونه‌ها و استانداردها	دمای نامناسب ترکیبات	اجازه دهید تمام ترکیبات به دمای اتاق رسید، سپس به آرامی ترکیب نمایید
	استفاده از کیت منقضی شده و یا نگهداری نامناسب معرف‌ها	تاریخ انقضای کیت را چک نموده و معرف‌ها را در شرایط مناسب نگهداری نمایید
	قرار گرفتن طولانی مدت معرف‌ها در معرض یخ	محلول کار را به صورت تازه آماده کنید
	زمان و درجه حرارت نامناسب انکوباسیون	به پروتکل مراجعه کرده و زمان و دمای مناسب انکوباسیون را بررسی نمایید
	استفاده از حجم‌های نامناسب	از سمپلر کالیبره شده استفاده نمایید
منحنی استاندارد غیر خطی (با ضریب رگرسیون زیر ۰/۸)	استفاده از ترکیبات نیمه گرم شده	قبل از آماده‌سازی محلول واکنش، همه اجزاء را به دمای مناسب رسانده سپس دوباره ترکیب نمایید
	خطاهای مرتبط با پیپت کردن در آماده‌سازی محلول‌های استاندارد	برای جلوگیری از خطا، از حجم‌های بالا استفاده نمایید
	خطاهای مربوط به مخلوط کردن محلول واکنش	محلول کار را با استفاده از ورتکس کامل مخلوط نمایید
	تشکیل حباب‌های هوا در چاهک‌ها	محتویات پیپت را به آرامی در چاهک‌ها خالی نمایید
	غلظت محلول استاندارد نادرست است	به دستورالعمل آماده‌سازی رقت‌های استاندارد در پروتکل مراجعه کنید
	خطاهای محاسبات	مراجعه به پروتکل، محاسبات را دوباره انجام دهید
نتایج غیر منتظره	نمونه‌ها در طول موج نادرست خوانده شوند	تنظیمات فیلتر و دستگاه را بررسی نمایید
	نمونه‌ها دارای محتویات مداخله‌گر باشند	در صورت امکان نمونه‌ها را بیشتر رقیق نمایید
	نمونه‌ها دارای پروتئین زیادی باشند	نمونه‌ها را با فیلتر ۱۰کیلودالتونی (10kDa MWCO centrifugal filter) فیلتر نمایید
	خواندن نمونه در بالا و یا زیر محدوده خطی	نمونه‌های غلیظ یا رقیق کرده تا خوانایی آن‌ها در محدوده خطی قرار گیرد

- در صورتی که در انجام هر یک از مراحل آزمایش دچار ابهام، مشکل یا اشتباه شده‌اید، نگران نباشید، تیم پشتیبانی فنی نوند سلامت در کنار شماست. کافی است به شماره تلفن ۰۹۰۱۴۱۱۴۰۹۷ از طریق واتساپ/تلگرام پیام دهید. کارشناسان ما برای رفع مشکل با شما تماس خواهند گرفت.
- نظرات و پیشنهادات مشتریان، همواره پله‌های پیشرفت و بهبود کیفیت را در نوند سلامت تشکیل می‌دهند. لذا در صورت وجود هرگونه نظر، انتقاد یا پیشنهاد، لطفا آن را از طریق ایمیل hi@navandsalamat.com با ما در میان بگذارید.

Copyright © 2022 Navand Salamat. All rights reserved