



کیت اندازه گیری فعالیت پراکسیدوکسین ها (PRX)

Peroxiredoxins Assay Kit CN. KPG-PRX

پراکسیدوکسین ها خانواده ای از پروتئین های آنتی اکسیدانی هستند که نقش حیاتی در حفظ تعادل ردوکس سلولی ایفا می کنند. این پروتئین ها با کاهش پراکسیدهای سلولی مانند هیدروژن پراکسید، از آسیب های اکسیداتیو به DNA، لیپیدها و پروتئین ها جلوگیری می کنند. پراکسیدوکسین ها در انواع موجودات از باکتری ها تا انسان یافت می شوند و در فرآیندهای مختلفی مانند تکثیر سلولی، آپوپتوز و پاسخ به استرس مشارکت دارند. شش ایزوفرم مختلف از این پروتئین ها در انسان شناسایی شده اند که هر یک در بخش های خاصی از سلول فعالیت می کنند. اختلال در عملکرد پراکسیدوکسین ها با بیماری هایی مانند سرطان، دیابت و بیماری های عصبی مرتبط است.

محتویات کیت:

۱. بافر رقیق کننده (Diluent Reagent) (KPG-PRXPBS0/17)
۲. بافر A (Buffer A) (KPG-PRXDETCa)
۳. بافر B (Buffer B) (KPG-PRXNAA)
۴. سوبسترا (Substrate) (KPG-GPXSUBTBHB)
۵. بافر رنگ زا (Dye Buffer) (KPG-GPXDYNB)
۶. پلیت الایزا

موارد مورد نیاز که در کیت موجود نیست: سمپلر و سر سمپلر، ۲. الایزا ریدر حاوی طول موج ۴۱۲ نانومتر

آماده سازی محلول ها:

- برای آماده سازی بافر A در کیت ۹۶ تستی به میزان ۲/۵ میلی لیتر (در کیت ۴۸ تستی ۱/۲۵ میلی لیتر) از بافر رقیق کننده را به ظرف بافر A اضافه کرده و به خوبی مخلوط کنید.
- برای آماده سازی بافر B در کیت ۹۶ تستی به میزان ۲/۵ میلی لیتر (در کیت ۴۸ تستی ۱/۲۵ میلی لیتر) از بافر رقیق کننده را به ظرف بافر B اضافه کرده و به خوبی مخلوط کنید.
- برای آماده سازی سوبسترا B در کیت ۹۶ تستی به میزان ۱۱/۲ میکرو لیتر (در کیت ۴۸ تستی ۵/۶ میکرو لیتر) از سوبسترا B را به ۲/۵ میلی لیتر (در کیت ۴۸ تستی به ۱/۲۵ میلی لیتر) از بافر رقیق کننده اضافه کرده (در ظرفی جداگانه) و به خوبی مخلوط کنید.
- برای آماده سازی بافر رنگ زا در کیت ۹۶ تستی به میزان ۵ میلی لیتر (در کیت ۴۸ تستی ۲/۵ میلی لیتر) از بافر رقیق کننده را به ظرف بافر رنگ زا اضافه کرده و به خوبی مخلوط کنید. دقت کنید که پودر کاملاً حل شده باشد. برای این منظور حداقل ۵ دقیقه روی شیکر و در دور RPM ۲۰۰ مخلوط کنید.

تمامی محلول ها بعد از آماده سازی ۷۲ ساعت در تاریکی پایدار هستند.

آماده سازی نمونه: در مواردی که از سرم، پلاسما یا ادرار استفاده می کنید نیازی به رقیق سازی نمونه نیست اما در صورتیکه در نهایت میزان فعالیت PRX در نمونه زیاد باشد رنگ نهایی کاملاً از دست رفته ($OD < 0.1$) و نمونه ها شبیه به هم خواهند شد. بنابراین در این موارد باید نمونه رقیق شود (معمولاً $\frac{1}{2}$). در مواردی که نمونه بافت می باشد، ابتدا ۵۰ میلی گرم از بافت را در ۵۰۰ میکرولیتر بافر رقیق کننده کاملاً هموژن کرده (این عمل در دمای سرد انجام شود، به طور مثال بافر رقیق کننده را با انکوبه یک ساعته در یخچال سرد کنید) و سپس در دور RPM ۱۰۰۰۰ به مدت ۱۰ دقیقه سانتریفیوژ کرده و در نهایت مایع رویی را برای انجام تست به میزان یک پنجم با بافر رقیق کننده رقیق کرده (مثلاً ۲۰ میکرولیتر نمونه با ۸۰ میکرولیتر بافر رقیق کننده) و سپس در تست استفاده کنید. دقت نمایید در صورتیکه در نهایت میزان کاهش رنگ محسوس نباشد میزان رقت را باید کم کرد (مثلاً $\frac{1}{2}$).

روش انجام تست:

۱. قبل از شروع آزمایش مطمئن شوید تمام محلول ها دارای دمای محیطی باشند.
۲. برای هر نمونه دو چاهک باید در نظر بگیرید، یکی برای تست PRX و دیگری برای بلانک نمونه. به چاهک نمونه ۵۰ میکرولیتر از بافر رقیق کننده و به بلانک هر نمونه ۷۰ میکرولیتر از بافر رقیق کننده اضافه کنید.
۳. ۲۰ میکرولیتر از نمونه به چاهک های تست اصلی و بلانک نمونه اضافه کنید.
۴. ۵ میکرولیتر بافر A و ۵ میکرولیتر بافر B به تمام چاهک ها، از جمله تست و بلانک نمونه اضافه کنید (می توان سوبسترای A و B را قبل از اضافه کردن به چاهک ها با هم مخلوط کرد و در نهایت ۱۰ میکرولیتر از این مخلوط به چاهک ها اضافه کنید (این مخلوط به مدت ۴۸ ساعت پایدار است)، پلیت را به آرامی حرکت داده تا مواد مخلوط شوند و به مدت ۵ دقیقه در دمای محیط انکوبه کنید.
۵. به چاهک های تست اصلی ۲۰ میکرولیتر از سوبسترا اضافه کرده (به چاهک های بلانک نمونه نباید اضافه شود)، پلیت را به آرامی حرکت داده تا مواد مخلوط شوند و به مدت ۵ دقیقه در دمای محیط انکوبه کنید.
۶. ۵۰ میکرولیتر از بافر رنگ زا اضافه کرده و به آرامی مخلوط کنید. پلیت را به مدت ۵ دقیقه در دمای محیط و در تاریکی انکوبه کنید و بلافاصله در طول موج ۴۱۲ نانومتر میزان جذب را اندازه گیری نمایید.
۷. محاسبات: برای محاسبه فعالیت PRX از فرمول های زیر استفاده کنید:

$$\text{Absorbance decrease rate per minute (ADRPM)} = \frac{\Delta A}{\Delta t} = \frac{A_{\text{Blank}} \times A_{\text{Test}}}{t}$$

در این فرمول A Blank مربوط به OD بلانک نمونه و A Test مربوط به OD تست PRX و t مربوط به زمان واکنش است که باید ۵ دقیقه در نظر گرفته شود.

$$\text{Thiol consumption rate (TCR)} (\mu\text{mol/min}) = \frac{\text{ADRPM} \times V_t \times 7.07}{1000}$$

در این فرمول V_t حجم کل است که ۰/۱۵ (سی سی) باید در نظر بگیرید. به عبارتی فرمول به صورت زیر است:

$$\text{TCR} (\mu\text{mol/min}) = \text{ADPRM} \times 0.0010605$$

در نهایت برای اندازه گیری فعالیت آنزیم های پراکسیدوکسین باید از فرمول زیر استفاده کنید:

$$\text{Enzyme activity (nmol/min/mL)} = \frac{V_s}{\text{TCR}} \times 1000$$

در این فرمول V_s حجم نمونه است که ۰/۰۲ (سی سی) باید در نظر بگیرید. به عبارتی فرمول به صورت زیر است:

$$\text{Enzyme activity (nmol/min/mL)} = \frac{20}{\text{TCR}}$$

در صورتیکه پروتئین توتال را نیز اندازه گیری کرده اید (پیشنهاد ما استفاده از کیت اندازه گیری توتال پروتئین کارمانیا پارس ژن است)، از فرمول زیر برای نرمال کردن داده ها استفاده کنید:

$$\text{Enzyme activity (nmol/min/mg)} = \frac{\text{Protein concentration (mg)}}{\text{TCR}} \times 1000$$

دستورالعمل های ایمنی: محلول های مورد استفاده در این کیت برای بافت انسان خطرناک هستند، از این رو، در موارد تماس با پوست، چشم و غیره، با آب شسته و برای درمان اضافی به بیمارستان مراجعه کنید.

کیت های مشابه در حیطه اکسیدان ها و آنتی اکسیدان ها تولیدی کارمانیا پارس ژن:

۱. کیت بررسی فعالیت تام آنتی اکسیدانی (FRAP)
 ۲. کیت بررسی فعالیت کاتالاز
 ۳. کیت بررسی فعالیت MDA
 ۴. کیت بررسی میزان NO
 ۵. کیت بررسی فعالیت پاراکسوناز-۱
 ۶. کیت بررسی میزان استیل کولین استراز
 ۷. کیت بررسی فعالیت SOD
 ۸. کیت اندازه گیری توتال پروتئین
 ۹. کیت بررسی فعالیت میلوپراکسیداز
- کارمانیا پارس ژن تولید کننده کیت های:
۱. الایزا برای اندازه گیری سایتوکین ها
 ۲. استخراج DNA و RNA به روش های ستونی، رسوبی و نانوذرات مگنت
 ۳. اندازه گیری miRNA ها
 ۴. محصولات مرتبط با کشت سلول مانند FBS، محیط کشت و سلول های سرطانی و بنیادی مزانشیمال
 ۵. میکروتیوب ها دستگاه های Real-Time PCR
 ۶. ستون های تخلیص DNA و RNA

در صورت داشتن سول فنی با ما در تماس باشید

WWW.KARMANIAPARSGEN.IR-۰۹۱۳۲۹۲۶۱۱۳