

## کیت اندازه گیری فعالیت تام آنتی اکسیدانی به روش CUPRAC Cupric Ion Reducing Antioxidant Capacity (CUPRAC) assay kit Catalog Nos. KPG-CUPRAC

در بیوشیمی بالینی و تحقیقات علوم زیستی، ارزیابی دقیق ظرفیت آنتی اکسیدانی کل (TAC) بدن یک پارامتر حیاتی برای درک وضعیت استرس اکسیداتیو محسوب میشود. استرس اکسیداتیو، که در نتیجه عدم تعادل بین تولید گونه های فعال اکسیژن (ROS) و دفاع آنتی اکسیدانی ایجاد میگردد، با پاتوژن طیف وسیعی از بیماریهای مزمن از جمله اختلالات قلبی-عروقی، نئوپلازها، دیابت و فرایند پیری مرتبط است. در حالی که اندازه گیری تک تک آنتی اکسیدانها روشی وقت گیر و ناکارآمد است، سنجش ظرفیت کل، تصویری یکپارچه و معنادار از قدرت دفاعی بدن در برابر عوامل اکسیداتیو ارائه مینماید. در این میان، روش CUPRAC با عنوان کامل ظرفیت احیای یون مس (Cupric Reducing Antioxidant Power) به عنوان یک روش طیف سنجی استاندارد، دقیق و قابل اعتماد، جایگاه ویژه ای یافته است. اساس کار این کیت بر اندازه گیری قدرت احیاءکنندگی آنتی اکسیدانهای موجود در نمونه (پلاسما، سرم، بافت، مواد غذایی و ...) از طریق کاهش یون مس دو ظرفیتی ( $Cu^{2+}$ ) به یون مس یک ظرفیتی ( $Cu^{+}$ ) استوار است. کمپلکس حاصل از  $Cu^{+}$  با یک لیگاند کروموفور، کمپلکس رنگی پایدار را تشکیل میدهد که شدت جذب آن در طول موج ۴۵۰ نانومتر، مستقیماً با غلظت کل ترکیبات احیاءکننده (آنتی اکسیدانی) در نمونه مرتبط است.

### • محتویات کیت:

۱. معرف CUPRAC (CUPRAC Reagent) (KPG-CUPRR)
۲. استاندارد CUPRAC (CUPRAC Standard) (KPG-StdVC)
۳. بافر رقیق کننده CUPRAC (Dilution Buffer) (KPG-CUPDW)
۴. پلیت الایزا

موارد مورد نیاز که در کیت موجود نیست:

سمپلر و سر سمپلر، سانتیفریوژ، الایزا ریدر، حاوی طول موج ۴۵۰ نانومتر

### آماده سازی استاندارد:

۵ میلی لیتر از بافر رقیق کننده را به بطری استاندارد اضافه کنید و خوب مخلوط کنید تا استاندارد اول کیت با غلظت ۱۰۰۰۰ میکرو مولار بر لیتر ( $\mu M/L$ ) به دست آید (OD مورد انتظار: ۱/۷-۲/۲). برای ایجاد استانداردهای ۲ تا ۶ طبق جدول زیر عمل کنید:

| Std | غلظت             | بافر رقیق کننده | استاندارد شماره ۱ | OD مورد انتظار |
|-----|------------------|-----------------|-------------------|----------------|
| 2   | 5000 $\mu M/L$   | 250 $\mu L$     | 250 $\mu L$       | ۱/۳-۱/۵        |
| 3   | 2500 $\mu M/L$   | 375 $\mu L$     | 125 $\mu L$       | ۰/۶-۰/۹        |
| 4   | 1250 $\mu M/L$   | 437.5 $\mu L$   | 62.5 $\mu L$      | ۰/۴-۰/۶        |
| 5   | 625 $\mu M/L$    | 468 $\mu L$     | 31 $\mu L$        | ۰/۳-۰/۴        |
| 6   | 312.5 $\mu M/L$  | 484.5 $\mu L$   | 15.5 $\mu L$      | ۰/۲-۰/۳        |
| 7   | 156.25 $\mu M/L$ | 492.25 $\mu L$  | 7.75 $\mu L$      | ۰/۱-۰/۲        |

استانداردها در دمای ۲۰- به مدت ۱ ماه پایدار هستند اما در دمای محیط بیش از ۵ ساعت پایداری ندارند.

### آماده سازی محلول ها:

برای آماده سازی معرف CUPRAC، در کیت ۹۶ تستی ۱۲ میلی لیتر (در کیت ۴۸ تستی ۶ میلی لیتر) آب مقطر را به بطری اضافه کنید و به مدت ۱۰ دقیقه بر روی شیکر با دور RPM ۲۰۰ قرار دهید تا خوب مخلول شوند. این معرف باید در کمتر از دو ساعت مصرف شود. در غیر اینصورت معرف را به مدت ۲۴ ساعت در دمای یخچال می توان نگه داری کرد.

**آماده سازی نمونه:** در مواردی که از سرم، پلاسما یا ادرار استفاده میکنید نیازی به رقیق سازی نمونه نیست اما در صورتیکه میزان آنتی اکسیدان در نمونه از بیشترین استاندارد کیت هم بالاتر بود، نمونه باید رقیق شود (معمولاً  $\frac{1}{2}$ ). در مواردی که نمونه بافت می باشد، ابتدا ۲۰ میلی گرم از بافت را در ۵۰۰ میکرولیتر بافر رقیق کننده کاملاً هموزن 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 سانتیفریوژ کرده و در نهایت مایع رویی را برای انجام تست به میزان یک سوم با بافر رقیق کننده رقیق کرده (مثلاً ۲۰ میکرولیتر نمونه با ۸۰ میکرولیتر بافر رقیق کننده A) و سپس در تست استفاده کنید. دقت نمایید در صورتیکه در نهایت میزان رنگ محسوس نباشد (OD کمتر از ۰/۲) میزان رقت را باید کم کرد. بنابراین قبل از انجام تست، حتماً یک نمونه را بررسی کرده و رقت مناسب را به دست آورید. از نمونه سوپرناونت کشت سلول به دلیل داشتن معرف های رنگی حساس به Ph استفاده نکنید بلکه نمونه سلول را بایستی ابتدا از محیط جمع آوری کرد سپس با PBS شستشو داد و سپس در بافر رپا مخصوص تست های استرس اکسیداتیو (میتوانید از کارمانیا پارس ژن تهیه کنید) با دستگاه سونیکاتور کاملاً لیز کرده و لیزات سلول را سانتیفریوژ کرده و از سوپرناتانت برای تست استفاده کنید. دقت نمایید، در صورتیکه دستگاه سونیکاتور ندارید، نمونه سلول غوطه ور شده در بافر رپا را به تعداد ۱۰ مرتبه فریز و ذوب کنید و در هر بار به شدت مخلوط کنید.

### روش انجام تست:

۱. قبل از شروع آزمایش، اجزای کیت را به مدت ۲۰ دقیقه در دمای اتاق نگه دارید.
۲. به میزان ۲۰ میکرولیتر از استاندارد به چاهک های مربوطه اضافه کنید. برای هر نمونه دو چاهک در نظر بگیرید، یکی برای انجام تست و دیگری به عنوان بلانک نمونه (به دلیل تداخل رنگ نمونه با رنگ ایجاد شده در طی واکنش، وجود بلانک برای هر نمونه الزامی است) و در ادامه به هر دو چاهک ۲۰ میکرولیتر نمونه اضافه کنید.
۳. به میزان ۱۰۰ میکرولیتر از محلول کار آماده شده به چاهک های استاندارد و چاهک مربوط به تست هر نمونه اضافه کنید. به چاهک های مربوط به بلانک نمونه باید به میزان ۱۰۰ میکرولیتر بافر رقیق کننده اضافه کنید.

|                 | چاهک بلانک نمونه | چاهک تست نمونه | چاهک استاندارد |
|-----------------|------------------|----------------|----------------|
| معرف CUPRAC     | -                | ۱۰۰ میکرولیتر  | ۱۰۰ میکرولیتر  |
| بافر رقیق کننده | ۱۰۰ میکرولیتر    | -              | -              |
| نمونه           | ۲۰ میکرولیتر     | ۲۰ میکرولیتر   | -              |
| استاندارد       | -                | -              | ۲۰ میکرولیتر   |

پس از مخلوط کردن (با حرکت دادن پلیت)، به مدت ۲ دقیقه در دمای اتاق انکوبه کنید و در ادامه در طول موج ۴۵۰ نانومتر اندازه گیری کنید. میزان آنتی اکسیدان موجود در نمونه با استفاده از نمودار به دست آمده قابل محاسبه خواهد بود. دقت نمایید که مقادیر نرمال بسته به نمونه، گونه، جنسیت، شرایط جغرافیایی و محیط شغلی بسیار متغیر خواهد بود اما به طور معمول با روش به کار رفته در این کیت، در نمونه سرم فرد سالم میزان آنتی اکسیدان ها در حدود ۸۰۰-۱۵۰۰ میکرومول بر لیتر می باشد. با این وجود برای تعیین میزان حد نرمال بایستی تعداد ۱۲۰ فرد سالم مورد ارزیابی قرار بگیرند و میانگین آن به عنوان حد سالم در جمعیت مورد نظر محسوب شود.

دقت داشته باشید برای نرمالایز کردن داده ها باید میزان توتال پروتئین را هم اندازه گیری کنید و نتایج به دست آمده از تست را بر توتال پروتئین تقسیم کرده و داده ها را به صورت  $nm/\mu g$  گزارش کنید.

**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 میزان استیل کولین
۸. کیت بررسی فعالیت SOD
۹. کیت اندازه گیری توتال پروتئین
۱۰. کیت بررسی فعالیت میلوپراکسیداز
۱۱. کیت سنجش مقادیر ROS
۱۲. کیت سنجش فعالیت همزمان ROS و میلوپراکسیداز
۱۳. کیت سنجش فعالیت GPX
۱۴. کیت سنجش فعالیت پراکسیدروکسین ها
۱۵. کیت سنجش فعالیت پراکسیداز شیر
۱۶. کیت سنجش فعالیت آلکالین فسفاتاز شیر
۱۷. کیت سنجش میزان GSSG (گلووتاتیون اکسید شده)
۱۸. کیت سنجش میزان واحدهای تیول آزاد (گلووتاتیون احیا)
۱۹. کیت سنجش فعالیت آرزیناز
۲۰. کیت سنجش وضعیت آنتی اکسیدان ها با روش DPPH
۲۱. کیت سنجش میزان کربونیل پروتئین پراکسیداز شیر
۲۲. کیت سنجش میزان توتال اکسیدان ها (TOS)
۲۳. کیت سنجش محصولات پروتئینی اکسید شده پیشرفته (AOPP)

**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
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
۷. سرمپلر های ۱۰ سانتی متری با و بدون فیلتر

**با ما در تماس باشید**

۰۹۱۳۲۹۲۶۱۱۳-۰۳۴۳۴۲۰۸۰۲۵

**WWW.KARMANIAPARSGEN.IR**