



کیت اندازه گیری ظرفیت خنثی سازی رادیکال آزاد بر اساس روش DPPH Free Radical Scavenging Capacity Assay Kit based on DPPH CN. KPG-DPH

روش DPPH (2,2-diphenyl-1-picrylhydrazyl) یکی از پرکاربردترین روش ها برای تعیین ظرفیت خنثی سازی رادیکال های آزاد در نمونه های گیاهی و جانوری (مانند سرم، پلاسما، بافت و ...) و همچنین دارویی می باشد. اگر چه انجام این آزمایش بر روی سرم یا پلاسما، شیرو برخی نمونه های دیگر که حاوی مقدار زیادی پروتئین و یا لیپید هستند با تغییراتی در روش کار و با ملاحظات قابل انجام است. روش DPPH به طور خلاصه به این صورت است که یک نمونه از ماده مورد نظر با محلول DPPH مخلوط می شود. سپس با استفاده از یک دستگاه الایزا ریدر میزان کاهش غلظت DPPH در طول زمان اندازه گیری می شود. با استفاده از داده های جذب نور، می توان فعالیت آنتی اکسیدانی نمونه را محاسبه کرد. به گونه ای که عوامل آنتی اکسیدانی موجب مصرف DPPH شده و هر چه میزان فعالیت آنتی اکسیدانی بیشتر باشد رنگ سوبسترا کمتر می شود.

محتویات کیت:

۱. بافر رقیق کننده A (Diluent Reagent A) (KPG-DPTE8): ۷۰ سی سی
 ۲. بافر رقیق کننده B (Diluent Reagent B) (KPG-DPSUBMETH): ۱۵ سی سی
 ۳. سوبسترا (Substrate) (KPG-DPSUBDP): ۲ ویال
 ۴. پروتئیناز K (Proteinase K) (KPG-PK): ۱ سی سی
 ۵. استاندارد (DPPH Standard) (KPG-DPPHSTD)
 ۶. پلیت الایزا
- موارد مورد نیاز که در کیت موجود نیست: ۱. سمپلر و سر سمپلر، ۲. الایزا ریدر حاوی طول موج ۵۱۷ نانومتر

آماده سازی محلول ها:

➤ برای آماده سازی سوبسترا، در کیت ۹۶ تستی ۱۲/۵ سی سی (در کیت ۴۸ تستی ۶/۲۵ سی سی) از بافر رقیق کننده B به هر ظرف سوبسترا اضافه کرده و به خوبی مخلوط کنید. دقت کنید این محلول باید در تاریکی و در یخچال نگهداری شود و تا یک هفته پایدار می ماند.

آماده سازی استاندارد:

به ظرف مربوط به استاندارد به میزان ۶۴ سی سی آب مقطر اضافه کنید. استاندارد آماده شده دارای (میکرومولار) $50 \mu\text{M}$ از آنتی اکسیدان ها می باشد (استاندارد آماده شده به مدت ۱ ماه در یخچال و ۶ ماه در فریزر قابل نگهداری می باشد). برای آماده سازی استاندارد اول یعنی $25 \mu\text{M}$ به میزان نیم سی سی از استاندارد $50 \mu\text{M}$ آماده شده را با نیم سی سی از بافر رقیق کننده B مخلوط کرده و این عمل را برای آماده سازی مقادیر $12.5 \mu\text{M}$ ، $6.25 \mu\text{M}$ و $3.125 \mu\text{M}$ ادامه دهید.

آماده سازی نمونه: در مواردی که از سرم، پلاسما یا ادرار استفاده میکنید نیازی به رقیق سازی نمونه نیست اما در صورتیکه میزان پروتئین در نمونه زیاد باشد باید نمونه رقیق شود (معمولاً $1/2$). در مواردی که نمونه بافت می باشد، ابتدا ۲۰ میلی گرم از بافت را در ۵۰۰ میکرولیتر بافر رقیق کننده A 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 A) و سپس در تست استفاده کنید. دقت نمایید در صورتیکه در نهایت میزان کاهش رنگ محسوس نباشد میزان رقت را باید کم کرد (مثلاً $1/2$). بنابراین قبل از انجام تست، حتماً یک نمونه را بررسی کرده و رقت مناسب را به دست آورید. از نمونه سوپرناتانت 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 سانتریفیوژ 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 مطمئن شوید تمام محلول ها دارای دمای محیطی باشند.
۲. ۱۰۰ میکرولیتر از نمونه را به یک میکروتیوب ۱/۵ سی سی اضافه کرده اضافه کنید و ۱۰۰ میکرولیتر بافر رقیق کننده A به همراه ۱۰ میکرولیتر پروتئیناز K اضافه کنید و بعد از مخلوط کردن، به مدت ۲ ساعت در دمای ۵۵ درجه سانتیگراد انکوبه کنید.
۳. ۱۰۰ میکرولیتر از هر نمونه و استاندارد های ۲۵، ۱۲/۵، ۶/۲۵ و ۳/۱۲ میکرومول را به چاهک های الایزا منتقل کنید. یک چاهک را هم به عنوان بلانک در نظر بگیرید و ۱۰۰ میکرولیتر از بافر رقیق کننده B به آن اضافه کنید.
۴. به میزان ۵۰ میکرولیتر سوبسترا به تمامی چاهک ها اضافه کنید و بعد از مخلوط کردن و انکوباسیون یک دقیقه ای در دمای محیط، در طول موج ۵۱۷ نانومتر میزان جذب نمونه ها، استانداردها و بلانک را اندازه گیری نمایید و بر طبق نمودار حاصل از استانداردها و کسر داده حاصل از بلانک از همه واکنش ها، نتایج را برحسب میکرومول گزارش کنید. برای گزارش داده ها بر حسب درصد مهار نیز می توانید از فرمول زیر استفاده کنید:

$$\text{Inhibition percent} = \frac{At}{Ab} \times 100$$

- در این فرمول At میزان جذب نمونه در طول موج ۵۱۷ نانومتر و Ab میزان جذب بلانک در طول موج ۵۱۷ نانومتر می باشد.
- در مواردی که دارو و یا ترکیب خاصی را مورد بررسی قرار می دهید، برای محاسبه IC50 باید رقتی که جذب آن در این فرمول پنجاه درصد نشان دهد را به عنوان IC50 انتخاب کنید.
 - در مواردی که نمونه شما فاقد پروتئین باشد نیازی به افزودن پروتئیناز K نیست و نیازی هم به انکوباسیون ۲ ساعته در دمای ۵۵ درجه نیست و مستقیماً بعد اضافه کردن نمونه و بافر رقیق کننده A وارد مرحله بعد شوید.
 - دقت داشته باشید، با توجه به اینکه آنتی اکسیدان ها باعث بی رنگ شدن سوبسترا می شوند، بنابراین هر چه میزان آن ها بیشتر باشد میزان رنگ کمتر می شود.
 - در صورتیکه میزان آنتی اکسیدان در نمونه شما زیاد باشد، یا نمونه را با بافر رقیق کننده A رقیق کنید، و یا استاندارد را از $50 \mu\text{M}$ شروع کنید و میزان سوبسترا را به ۱۰۰ میکرولیتر افزایش دهید.

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 ساینوکین 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

۰۹۱۳۲۹۲۶۱۱۳

WWW.KARMANIAPARSGEN.IR
karmaniaparsgene@gmail.com



Free Radical Scavenging Capacity Assay Kit based on DPPH CN. KPG-GPX96

The DPPH (2,2-diphenyl-1-picrylhydrazyl) method is one of the most widely used methods for determining the free radical neutralization capacity in plant and animal samples (such as serum, plasma, tissue, etc.) and also pharmaceuticals. Although this test can be performed on serum or plasma, milk, and some other samples that contain a large amount of protein or lipid with some changes in the working method and with some considerations. The DPPH method is briefly as follows: a sample of the desired substance is mixed with a DPPH solution. Then, using an ELISA reader, the decrease in DPPH concentration over time is measured. Using light absorption data, the antioxidant activity of the sample can be calculated. In such a way that antioxidant agents cause DPPH consumption, and the higher the antioxidant activity, the lower the color of the substrate.

Kit Contents:

1. Diluent Reagent A (KPG-DPTE8): 70 cc
2. Diluent Reagent B (KPG-DPSUBMETH): 15 cc
3. Substrate (KPG-DPSUBDP)
4. Proteinase K (KPG-PK): 1 cc
5. DPPH Standard (KPG-DPPHSTD)
6. ELISA Plate (96 Wells)

Required items not included in the kit: 1. Sampler and sampler head, 2. ELISA reader containing 517 nm wavelength.

Preparation of solutions: •

- To prepare the substrate, in 96 tests add 12.5 cc (6.5 cc in 48 tests kit) of Diluent Buffer B to the substrate container and mix well. Note that this solution should be stored in the dark and refrigerated and is stable for up to one week.
- To prepare the standard, add 64 cc of distilled water to the standard container. The prepared standard contains 50 μM (micromolar) of antioxidants. To prepare the first standard, 25 μM , mix 0.5 cc of the prepared 50 μM standard with 0.5 cc of Diluent Buffer B and continue this process to prepare 12.5 μM , 6.25 μM , and 3.12 μM .

Sample Preparation:

When using serum, plasma, or urine, there is no need to dilute the sample. However, if the protein concentration in the sample is high, the sample should be diluted (usually 1:2).

For tissue samples, first homogenize 20 mg of tissue in 500 μL of Dilution Buffer A thoroughly (this should be done at a cold temperature—for example, chill the dilution buffer by incubating it on ice for one hour). Then, centrifuge at 10,000 RPM for 10 minutes. Finally, dilute the supernatant 1:5 with Dilution Buffer A (e.g., 20 μL sample + 80 μL Dilution Buffer A) before use in the test.

Note: If the color reduction is not significant, the dilution factor should be decreased (e.g., 1:2). Therefore, before performing the test, always check one sample to determine the appropriate dilution. Do not use the cell culture supernatant for the test, as it contains pH-sensitive color indicators. Instead, first collect the cell sample from the culture medium, wash it with PBS, and then completely lyse the cells in RIPA buffer specifically intended for oxidative stress tests (you can obtain this from Karmania Pars Gene) using a sonicator. Centrifuge the cell lysate and use the resulting supernatant for the test. Note: If you do not have a sonicator, freeze and thaw the cell sample immersed in RIPA buffer 10 times, mixing vigorously each time.

Test Procedure:

Before starting the experiment, ensure all solutions are at room temperature.

Add 100 μL of the sample to a 1.5 mL microtube, followed by 100 μL of Dilution Buffer A and 10 μL of Proteinase K. Mix well and incubate at 55°C for 2 hours.

Transfer 100 μL of each sample and the standards (25, 12.5, 6.25, and 3.12 μmol) to ELISA wells. Designate one well as the blank and add 100 μL of Dilution Buffer B to it.

Add 50 μL of substrate to all wells. After mixing and incubating for 1 minute at room temperature, measure the absorbance of the samples, standards, and blank at 517 nm.

Subtract the blank absorbance from all readings and report the results in μmol based on the standard curve.

To express results as **percent inhibition**, use the following formula:

$$\text{Inhibition percent} = \frac{A_t}{A_b} \times 100$$

Where:

A_t = Absorbance of the sample at 517 nm

A_b = Absorbance of the blank at 517 nm

When evaluating a specific drug or compound, calculate the **IC₅₀** by selecting the dilution that yields 50% absorbance in this formula.

Notes:

If your sample does not contain protein, **Proteinase K addition and 2-hour incubation at 55°C are unnecessary**. Proceed directly to the next step after adding the sample and Dilution Buffer A.

- Since antioxidants decolorize the substrate, higher antioxidant levels result in less color.
- If the antioxidant concentration in your sample is high:
 - Either dilute the sample with Dilution Buffer A,
 - Or start the standard curve from **50 μM** and increase the substrate volume to **100 μL** .

Safety Instructions: The solutions used in this kit are hazardous to human tissue, hence, in cases of contact with skin, eyes, etc., wash with water and go to hospital for additional treatment.

Similar kits in the field of oxidants and antioxidants produced by Karmania Pars Gene:

1. Total Antioxidant Activity (FRAP) Testing Kit
2. Catalase Activity Testing Kit
3. MDA Activity Testing Kit
4. NO Level Testing Kit
5. Paraonase-1 Activity Testing Kit
6. Protein Carbonyl Level Testing Kit
7. SOD Activity Testing Kit
8. Acetylcholinesterase Activity
9. ...

Other products:

1. ELISA for measuring cytokines
2. DNA and RNA extraction by column, sedimentation and magnetic nanoparticles methods
3. Measurement of miRNAs 10. Products related to cell culture such as FBS, culture medium and cancer and mesenchymal stem cells
4. Microtubes Real-Time PCR devices
5. DNA and RNA purification columns

Contact us

+989132926113

WWW.KARMANIAPARSGEN.IR

karmaniaparsgene@gmail.com