



کیت اندازه گیری فعالیت تام آنتی اکسیدانی Ferric Reducing Ability of Plasma (FRAP) assay kit Catalog Nos. KPG-FRAP

• محتویات کیت:

۱. محلول A (CN. KPG-Sa)
۲. محلول B (CN. KPG-Sb)
۳. محلول C (CN. KPG-Sc)
۴. محلول D (CN. KPG-Sd)
۵. محلول E (CN. KPG-Se)
۶. استاندارد (CN. KPG-StdFRAP)

موارد مورد نیاز که در کیت موجود نیست: سمپلر و سر سمپلر، سانتریفیوژ، الایزا ریدر حاوی طول موج ۵۹۳ نانومتر

آماده سازی محلول ها:

برای آماده سازی محلول A، در کیت ۹۶ تستی ۱/۲۵ میلی لیتر (در کیت ۴۸ تستی ۰/۶۲۵ میلی لیتر) محلول E را به هر بطری محلول A اضافه کنید و خوب مخلوط کنید.

➤ برای تهیه محلول B، در کیت ۹۶ تستی ۱/۲۵ میلی لیتر (در کیت ۴۸ تستی ۰/۶۲۵ میلی لیتر) آب مقطر دیونیزه (DDW) را به هر بطری محلول B اضافه کنید و خوب مخلوط کنید.

➤ برای تهیه محلول C، در کیت ۹۶ تستی ۱۵ میلی لیتر (در کیت ۴۸ تستی ۷/۵ میلی لیتر) محلول D را به بطری محلول C اضافه کنید و خوب مخلوط کنید.

دقت کنید که محلول A، B و C بعد از آماده سازی یک هفته پایداری دارد. بنابراین برای اینکه کاربر دو بار بتواند از کیت استفاده کند، از این محلول ها ۲ عدد در کیت وجود دارد. بنابراین در زمان نیاز هر کدام را آماده سازی کنید.

آماده سازی نمونه: در مواردی که از سرم، پلاسما یا ادرار استفاده میکنید نیازی به رقیق سازی نمونه نیست اما در صورتیکه در نهایت میزان فعالیت TAC در نمونه زیاد باشد رنگ نهایی بسیار زیاد شده و OD بیش از ۲/۵ خواهد شد و نمونه ها شبیه به هم خواهند شد. بنابراین در این موارد باید نمونه رقیق شود. 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 رنگ محسوس نباشد میزان رقت را باید کم کرد (مثلاً $\frac{1}{2}$). 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.

آماده سازی محلول کار:

محلول های A، B و C باید بلافاصله قبل از آزمایش با نسبت ۱۰/۱/۱ مخلوط شوند تا محلول کار ایجاد شود. به عنوان مثال، اگر نیاز به بررسی ۲ نمونه دارید، ۳۰۰ میکرولیتر محلول کار را به این صورت آماده کنید: ۲۵ میکرولیتر از محلول A، ۲۵ میکرولیتر از محلول B و ۲۵۰ میکرولیتر از محلول C را مخلوط کنید. مخلوط فقط به مدت ۳۰ دقیقه پایدار است و باید بلافاصله قبل از تست آماده شود.

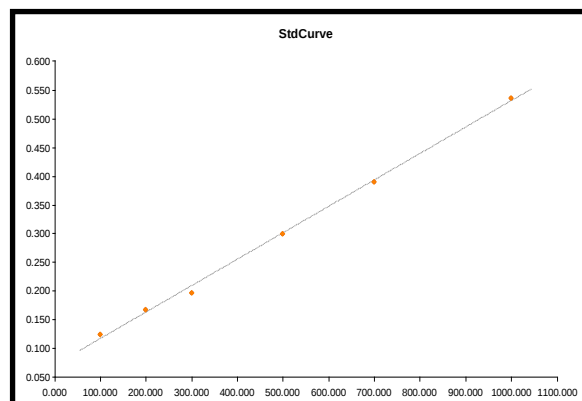
آماده سازی استانداردها:

۳۱ میلی لیتر آب مقطر دیونیزه (DDW) را به بطری استاندارد اضافه کنید و خوب مخلوط کنید تا محلول Fe^{2+} ۲ میلی مولار به دست آید و سپس رقت های سریالی را با استفاده از جدول زیر برای ایجاد استاندارد ۱ تا ۶ و با استفاده از محلول ۲ میلی مولار ایجاد کنید:

Std	Concentrations (Fe^{2+})	H ₂ O	Fe^{2+} 2mm
1	1 mM (1000 μ M/mL)	500 μ L	500 μ L
2	0.7 mM (700 μ M/mL)	650 μ L	350 μ L
3	0.5 mM (500 μ M/mL)	750 μ L	250 μ L
4	0.3 mM (300 μ M/mL)	850 μ L	150 μ L
5	0.2 mM (200 μ M/mL)	900 μ L	100 μ L
6	0.1 mM (100 μ M/mL)	950 μ L	50 μ L

روش انجام تست:

۱. قبل از شروع آزمایش، اجزای کیت را به مدت ۲۰ دقیقه در دمای اتاق نگه دارید.
 ۲. به میزان ۱۰ میکرولیتر از نمونه، استانداردها و آب مقطر به ترتیب به چاهک های پلیت الایزا مربوط به نمونه، استانداردها و بلانک اضافه کنید.
 ۳. ۱۴۰ میکرولیتر از محلول کار به تمامی چاهک ها اضافه کنید و به مدت ۳۰ ثانیه مخلوط کنید.
- پلیت را در دمای ۳۷ درجه سانتیگراد به مدت ۵ دقیقه انکوبه کرده و سپس OD نمونه ها به همراه استانداردها و بلانک را در طول موج ۵۹۳ نانومتر اندازه گیری کنید.



نمونه منحنی استاندارد. لطفا خودتان منحنی استاندارد را رسم کنید و از منحنی استفاده نکنید.

دقت داشته باشید برای نرمالایز کردن داده ها باید میزان توتال پروتئین را هم اندازه گیری کنید و نتایج به دست آمده از TAC را بر توتال پروتئین تقسیم کرده و داده ها را به صورت μ M/ μ g گزارش کنید (برای اندازه گیری توتال پروتئین، پیشنهاد میکنیم از کیت توتال پروتئین کارمانیا پارس ژن استفاده 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.

با ما در تماس باشید

۰۹۱۳۲۹۲۶۱۱۳-۰۳۴۳۴۲۰۸۰۲۵

WWW.KARMANIAPARSGEN.IR



Ferric Reducing Ability of Plasma (FRAP) assay kit Catalog Nos. KPG-FRAP

Contents of the kit:

1. Solution A (CN. KPG-Sa)
2. Solution B (CN. KPG-Sb)
3. Solution C (CN. KPG-Sc)
4. Solution D (CN. KPG-Sd)
5. Solution E (CN: KPG-Se)
6. Standard (CN. KPG-StdFRAP)

Required items that are not included in the kit:

1. Sampler and sampler head
2. Centrifuge
3. ELISA reader containing a wavelength of 593 nm

Preparation of solutions:

- To prepare solution A, in a 96-test kit, add 1.25 ml (0.625 ml in a 48-test kit) of solution E to each bottle of solution A and mix well.
- To prepare solution B, in a 96-test kit, add 1.25 ml (0.625 ml in a 48-test kit) of deionized distilled water (DDW) to each bottle of solution B and mix well.
- To prepare solution C, in a 96-test kit, add 15 ml (7.5 ml in a 48-test kit) of solution D to each bottle of solution C and mix well.
- Note that solutions A, B and C are stable for one week after preparation. Therefore, in order for the user to be able to use the kit twice, there are 2 of these solutions in the kit. Therefore, prepare each one when needed.

Sample Preparation: In cases where you are using serum, plasma, or urine, sample dilution is not required. However, if the TAC activity level in the sample is very high, the final color will become too intense, and the OD will exceed 2.5, causing the samples to appear similar. Therefore, in such cases, the sample should be diluted. In cases where the sample is tissue, first thoroughly homogenize 50 mg of tissue in 500 μ L of dilution buffer (this should be done at a cold temperature; for example, pre-cool the dilution buffer by incubating it in the refrigerator for one hour). Then, centrifuge at 10,000 RPM for 10 minutes. Finally, dilute the supernatant one-fifth with the dilution buffer (e.g., 20 μ L of sample with 80 μ L of dilution buffer) and use it in the test. Note that if the color is not noticeable in the end, the dilution factor should be decreased (e.g., to 1/2). Do not use cell culture supernatant samples because they contain pH-sensitive-colored reagents. Instead, first collect the cell sample from the culture medium, wash it with PBS, then completely lyse the cells in RIPA buffer specifically for oxidative stress tests (you can obtain this from Karmania Pars Gene) using a sonicator. Centrifuge the cell lysate and use the 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.

Preparation of working solution:

Solutions A, B and C should be mixed immediately before the test in a ratio of 1/10 to create a working solution. For example, if you need to examine 2 samples, prepare 300 μ L of working solution as follows: mix 25 μ L of solution A, 25 μ L of solution B and 250 μ L of solution C. The mixture is only stable for 30 minutes and should be prepared immediately before testing.

Preparation of standards:

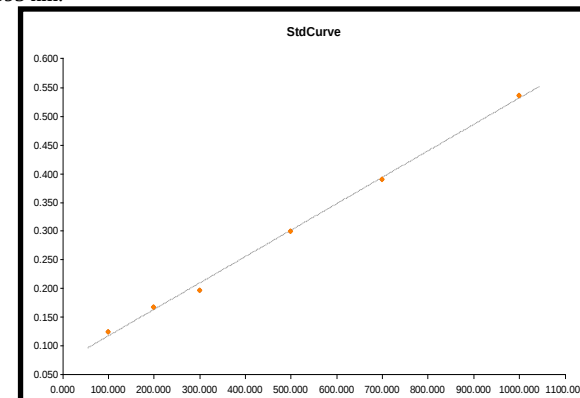
Add 31 mL of deionized distilled water (DDW) to the standard bottle and mix well to obtain a 2 mM Fe^{2+} standard, and then make serial dilutions using the table below to create standards 1 to 6 using a 2 mM solution. create:

Standards are stable at room temperature for 3 months in the dark.

Std	Concentrations (Fe^{2+})	H_2O	Fe^{2+} 2mm
1	1 mM (1000 μ M)	500 μ L	500 μ L
2	0.7 mM (700 μ M)	650 μ L	350 μ L
3	0.5 mM (500 μ M)	750 μ L	250 μ L
4	0.3 mM (300 μ M)	850 μ L	150 μ L
5	0.2 mM (200 μ M)	900 μ L	100 μ L
6	0.1 mM (100 μ M)	950 μ L	50 μ L

Test method:

1. Keep the kit components at room temperature for 20 minutes before starting the test.
 2. Add 10 microliters of sample, standards and distilled water respectively to the wells of the ELISA plate corresponding to the sample, standards and blank.
 3. Add 140 μ L of working solution to all wells and mix for 30 seconds.
- Incubate the plate at 37°C for 5 minutes and then measure the OD of the samples along with the standards and the blank at a wavelength of 593 nm.



Sample standard curve. Please draw the standard curve yourself and do not use the curve.

Please note that for normalizing the data, you must also measure the total protein level, divide the TAC results by the total protein, and report the data as $\mu\text{M}/\mu\text{g}$. (For measuring total protein, we recommend using the Karmania Pars Gene total protein kit.)

Safety instructions:

The solutions used in this kit are hazardous to human tissue, therefore, in case of contact with skin, eyes, etc., wash with water and refer to hospital for additional treatment.

Contact us

00989132926113-00982191692296

karmaniaparsgene@gmail.com

WWW.KARMANIAPARSGEN.IR