

## کیت سنجش شاخص استرس اکسیداتیو (OSI)

### CN. KPG-OSI

استرس اکسیداتیو حاصل عدم تعادل بین تولید گونه‌های فعال اکسیداتیو و توانایی سیستم دفاعی آنتی‌اکسیدانی بدن است. این وضعیت با پاتوژن بیماری‌های مزمن متعددی از جمله اختلالات قلبی-عروقی، سرطان، دیابت و فرآیند پیری مرتبط است. اندازه‌گیری مجزای آنتی‌اکسیدان‌ها یا اکسیدان‌ها، تصویر کاملی از وضعیت استرس اکسیداتیو ارائه نمی‌دهد؛ چراکه استرس اکسیداتیو یک نسبت است، نه یک مقدار مطلق. شاخص استرس اکسیداتیو (OSI) با محاسبه نسبت TOS به TAC، معیاری دقیق و قابل اعتماد برای ارزیابی تعادل اکسیدانی-آنتی‌اکسیدانی فراهم می‌کند. کیت سنجش OSI شرکت کارمانیا پارس ژن، یک راه‌حل جامع، اقتصادی و دقیق برای اندازه‌گیری همزمان دو پارامتر حیاتی TAC و TOS در یک آزمایش است. این کیت با بهره‌گیری از روش‌های استاندارد و معتبر، امکان محاسبه مستقیم شاخص OSI را بدون نیاز به تطبیق واحدها و با کمترین خطا فراهم می‌آورد.

### اصول روش‌های اندازه‌گیری TOS و TAC

۱. اندازه‌گیری ظرفیت آنتی‌اکسیدانی کل (TAC) به روش CUPRAC و بر اساس توانایی احیاکنندگی ترکیبات آنتی‌اکسیدانی موجود در نمونه استوار است. در این روش، یون مس دوظرفیتی ( $Cu^{2+}$ ) توسط آنتی‌اکسیدان‌های نمونه به یون مس یکظرفیتی ( $Cu^{+}$ ) احیا می‌شود. یون  $Cu^{+}$  تولید شده با یک لیگاند کروموزن، کمپلکس رنگی پایداری تشکیل می‌دهد که شدت جذب آن در طول موج ۴۵۰ نانومتر، به طور مستقیم با غلظت کل ترکیبات احیاکننده (آنتی‌اکسیدان‌ها) در نمونه متناسب است.

۲. اندازه‌گیری وضعیت اکسیدانی کل (TOS) بر اساس اکسیداسیون یون  $Fe^{2+}$  به  $Fe^{3+}$  توسط عوامل اکسیدکننده موجود در نمونه، در محیط اسیدی انجام می‌شود. یون  $Fe^{3+}$  تولید شده با کروموزن زایلنول اورنج، کمپلکس رنگی آبی-بنفش تشکیل می‌دهد که شدت جذب آن در طول موج ۵۶۰ نانومتر، با وضعیت اکسیدانی کل نمونه رابطه مستقیم دارد.

### محتویات کیت:

۱. معرف وضعیت تام اکسیدانی (Reagent TOS) (KPG-RTOS)
۲. بافر رقیق کننده معرف TOS (TOS Dilution Buffer) (KPG-PBSS2/7)
۳. بافر رقیق کننده استاندارد TOS (Standard Dillution buffer) (KPG-PBSS6)
۴. استاندارد وضعیت تام اکسیدانی (TOS Standard) (KPG-TOSST)
۵. معرف TAC (CUPRAC Reagent) (KPG-CUPRR)
۶. استاندارد TAC (CUPRAC Standard) (KPG-StdVC)
۷. بافر رقیق کننده TAC (KPG-CUPDW) (Dilution Buffer)
۸. پلیت الیزا

موارد مورد نیاز: سمپلر و سر سمپلر، الیزا ریدر حاوی طول موج ۴۵۰ و ۵۶۰ نانومتر

### آماده سازی محلول ها:

معرف وضعیت تام اکسیدانی به صورت پودر است و باید در کیت ۹۶ تستی به آن ۵۰ میلی لیتر (در کیت ۴۸ تستی ۲۵ سی سی) بافر رقیق کننده معرف اضافه نمایید. معرف در دمای محیط به مدت یک ساعت پایداری دارد. بنابراین در زمان نیاز معرف را آماده کنید و در کمتر از یک ساعت از کیت استفاده کنید. در صورت نگهداری معرف وضعیت تام اکسیدانی بعد از انجام تست، به مرور زمان رنگ معرف عوض خواهد شد و بنفش رنگ خواهد شد. در صورت نیاز مجدد ابتدا به معرف اسید HCL غلیظ اضافه کرده تا رنگ معرف نارنجی رنگ شود و سپس مجدد استفاده نمایید. دقت کنید که در این حالت حساسیت کیت کاهش پیدا می‌کند.

### آماده سازی نمونه:

تذکر مهم: نمونه‌ها باید بلافاصله پس از جمع‌آوری بررسی شوند یا در دمای ۸۰- درجه سانتی‌گراد نگهداری گردند. از تکرار سیکل‌های انجام و ذوب خودداری کنید.

۱. نمونه‌های مایع (سرم، پلاسما، ادرار): نمونه‌ها را می‌توان به طور مستقیم تست کرد. در صورت بالا بودن غلظت اکسیدان‌ها برای TOS، تغییر رنگ نهایی به جای بنفش، خاکستری می‌شود. نمونه باید رقیق شود (معمولاً ۱:۲).

۲. نمونه‌های بافت: حدود ۲۰-۵۰ میلی گرم بافت را در ۵۰۰ میکرولیتر بافر رقیق کننده سرد (مربوط به هر کیت) هموزن کنید (انجام این کار در دمای سرد الزامی است) سپس در دور ۱۰۰۰۰ RPM به مدت ۱۰ دقیقه در دمای ۴ درجه سانتی‌گراد سانتریفیوژ کنید و از مایع رویی برای آزمایش استفاده کنید.

برای تعیین رقت نمونه حتماً برای هر دو تست، تیتراسیون انجام دهید.

۳. نمونه‌های کشت سلولی:

از: سوپرناتانت کشت سلول استفاده نکنید. سلول‌ها را جمع‌آوری کرده، با PBS شستشو دهید و سپس در بافر RIPA مخصوص تست‌های استرس اکسیداتیو (قابل تهیه از کارمانیا پارس ژن) لیز کنید (با استفاده از سونیکاتور یا ۱۰ سیکل انجماد-ذوب همراه با مخلوط کردن شدید). لیزات سلولی را سانتریفیوژ کرده و از مایع رویی برای تست استفاده کنید.

### آماده سازی استاندارد TOS:

به ویال حاوی استاندارد ۵ سی سی بافر رقیق کننده استاندارد اضافه کنید و خوب مخلوط کنید. در این حالت ۲/۵ میلی مولار بر میلی لیتر (mM/mL) از محلول استاندارد آماده شده است. برای ساخت محلول های ۰/۸۳، ۰/۲۷، ۰/۰۹ میلی مولار بر میلی لیتر، باید طبق جدول زیر عمل کنید. استاندارد کیت به مدت ۱ ماه در دمای محیط پایداری دارد.

| Std | غلظت       | بافر رقیق کننده استاندارد | بافر رقیق کننده استاندارد |
|-----|------------|---------------------------|---------------------------|
| 2   | 2.5 mM/mL  | 0 µL                      | 600 µL                    |
| 3   | 0.83 mM/mL | 400 µL                    | 200 µL                    |
| 4   | 0.27 mM/mL | 534 µL                    | 66 µL                     |
| 5   | 0.09 mM/mL | 578 µL                    | 22 µL                     |

### آماده سازی استاندارد TAC:

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 (µM/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 |
|-----|-------------|-----------------|-------------------|
| 2   | 5000 µM/L   | 250 µL          | 250 µL            |
| 3   | 2500 µM/L   | 375 µL          | 125 µL            |
| 4   | 1250 µM/L   | 437.5 µL        | 62.5 µL           |
| 5   | 625 µM/L    | 468 µL          | 31 µL             |
| 6   | 312.5 µM/L  | 484.5 µL        | 15.5 µL           |
| 7   | 156.25 µM/L | 492.25 µL       | 7.75 µL           |

### روش انجام تست TOS:

۱. قبل از شروع آزمایش، اجزای کیت را به مدت ۲۰ دقیقه در دمای اتاق نگه دارید.
۲. به میزان ۱۰۰ میکرولیتر از نمونه و ۱۰ میکرولیتر از هر یک از استانداردهای ۲/۵ تا ۰/۰۹ میلی مولار بر میلی لیتر (mM/mL) را به میکروتیوب های مناسب (به طور مثال میکروتیوب ۱/۵ سی سی) اضافه کنید به یکی از میکروتیوب ها ۱۰ میکرولیتر بافر رقیق کننده استاندارد به عنوان بلانک اضافه کنید.
۳. به میزان ۴۰۰ میکرولیتر معرف وضعیت تام اکسیدانی به تمام میکروتیوب ها اضافه کنید و به خوبی مخلوط کنید. دقت نمایید ابتدا معرف را به میکروتیوب نمونه ها و سپس به میکروتیوب مربوط به استاندارد ها و بلانک اضافه کنید.
۴. میکروتیوب ها را مخلوط و در دمای محیط به مدت ۴ دقیقه انکوبه کرده و در ادامه ۲۰۰ میکرولیتر از محلول نهایی را به پلیت الیزا منتقل و در طول موج ۵۶۰ نانومتر اندازه گیری کنید. دقت نمایید تبدیل رنگ نارنجی به بنفش نشان دهنده انجام واکنش است.

محاسبات: داده ها بر اساس میلی مولار بر میلی لیتر گزارش کنید.

### روش انجام تست TAC:

۱. قبل از شروع آزمایش، اجزای کیت را به مدت ۲۰ دقیقه در دمای اتاق نگه دارید. و در ادامه، 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.

۲. 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 |
|------------------|----------------|----------------|
| -                | ۱۰۰ میکرولیتر  | ۱۰۰ میکرولیتر  |
| ۱۰۰ میکرولیتر    | -              | -              |
| ۲۰ میکرولیتر     | ۲۰ میکرولیتر   | -              |
| -                | -              | 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.

محاسبات OSI:

برای محاسبه میزان OSI ابتدا بایستی واحد داده های حاصل از TAC به میکرومولار بر لیتر تبدیل شود (یعنی در عدد ۱/۰۰۰/۰۰۰ ضرب شوند، سپس با استفاده از فرمول زیر OSI محاسبه شود:

$$OSI = \frac{TOS (\mu mol/L)}{TAC (\mu mol/L)} \times 10$$

مقادیر بالاتر OSI نشان دهنده استرس اکسیداتیو بیشتر است.

برای تک تک نمونه ها شاخص OSI را بررسی کرده و سپس آنالیز آماری را انجام 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.

با ما در تماس باشید

۰۹۱۳۲۹۲۶۱۱۳

WWW.KARMANIAPARSGEN.IR  
karmaniaparsgene@gmail.com