



کیت تشخیص فعالیت اسید فسفاتاز Acid Phosphatase Assay Kit CN. KPG-APAK

این کیت یک روش رنگ‌سنجی سریع و آسان برای اندازه‌گیری فعالیت آنزیم اسید فسفاتاز در نمونه‌های بافت، سرم یا سایر زیست‌نمونه‌ها فراهم می‌کند. اساس کار این کیت، استفاده از بافر رنگ‌زا (سوپسترای pNPP) است که در حضور آنزیم اسید فسفاتاز هیدرولیز شده و محصول زرد رنگی به نام پارا-نیتروفنول (PNP) تولید می‌کند. پس از ۱۰ دقیقه انکوباسیون در دمای ۳۷ درجه سانتی‌گراد، با افزودن بافر متوقف‌کننده، واکنش خاتمه یافته و رنگ ایجاد شده در طول موج ۴۰۵ نانومتر اندازه‌گیری می‌شود. شدت رنگ ایجاد شده با میزان فعالیت آنزیم نمونه رابطه مستقیم دارد.

کیت تشخیص فعالیت اسید فسفاتاز شرکت کارمانیا پارس ژن، یک روش رنگ‌سنجی سریع و حساس برای تشخیص فعالیت آنزیم اسید فسفاتاز است. این کیت امکان تعیین میزان فعالیت آنزیم را در مدت ۱۵ دقیقه فراهم می‌کند.

احتیاط‌های استفاده

محلول موجود در کیت برای انسان دارای خطر می‌باشد، بنابراین از تماس با پوست اجتناب کنید.

شرایط نگهداری: دمای ۲ تا ۸ درجه سانتی‌گراد.

ماندگاری: مطابق تاریخ درج شده روی بسته‌بندی.

محتویات کیت:

۱. بافر نمونه (Sample dilution Buffer) (KPG-APSB)
۲. بافر رنگ‌زا (Dying Buffer) (KPG-APDB)
۳. بافر متوقف‌کننده (Stopping Buffer) (KPG-APStB)
۴. پلیت الایزا

آماده سازی معرف‌ها:

بافر نمونه به صورت آماده به کار است و نیاز به آماده سازی ندارد. بافر رنگ‌زا نیاز به آماده سازی دارد و بایستی به میزان ۵ میلی لیتر آب مقطر به آن اضافه و به خوبی مخلوط شود. بعد از آماده سازی این محلول به مدت ۱ ماه در دمای یخچال پایداری دارد. بافر متوقف کننده آماده به کار است و نیاز به آماده سازی ندارد.

مواد مورد نیاز (غیر از محتویات کیت): پیت‌های دقیق (۵۰ و ۱۰۰ میکرولیتر)، انکوباتور ۳۷ درجه سانتی‌گراد

با ما در تماس باشید: ۰۹۱۳۲۹۲۶۱۱۳
karmaniaparsgene@gmail.com
WWW.KARMANIAPARSGEN.IR

آماده سازی نمونه: نمونه سرم را مستقیماً در تست استفاده کنید. برای نمونه بافت، ابتدا ۵۰ میلی گرم بافت را در ۵۰۰ میکرولیتر بافر نمونه کاملاً هموزن کرده سپس در دور RPM ۱۰/۰۰۰ به مدت ۱۰ دقیقه سانتریفیوژ کرده و از مایع رویی که کاملاً شفاف (البته ممکن است رنگی باشد) استفاده کنید. سلول کشت شده را باید به تعداد ۱ میلیون سلول در ۳۰۰ میکرولیتر بافر نمونه سوسپانسیون کرده و در دستگاه سونیکاتور در سه برنامه پنج دقیقه ای با قدرت ۷۵ و به صورت ۴ ثانیه پالس و ۲ ثانیه استراحت و بر روی یخ کاملاً پاره کرد. در صورتیکه در تست این روش به خوبی جوابگو نباشد باید سلول ها را در ادامه پنج مرتبه منجمد و ذوب کرد. دقت نمایید در صورتیکه سونیکاتور در اختیار ندارید نمونه را ۱۰ مرتبه منجمد و ذوب کنید.

روش کار

۱. برای هر نمونه دو چاهک در نظر بگیرید (یکی برای انجام تست اسید فسفاتاز و دیگری به عنوان بلانک نمونه) به چاهک اول نمونه (چاهک انجام تست اسید فسفاتاز) ۱۰۰ میکرولیتر از بافر نمونه و به چاهک دوم نمونه (چاهک بلانک نمونه) ۱۵۰ میکرولیتر بافر نمونه اضافه کنید. یک چاهک را هم به عنوان بلانک بافر رنگ‌زا در نظر بگیرید و به آن ۱۲۵ میکرولیتر بافر نمونه اضافه کنید.
۲. به میزان ۲۵ میکرولیتر نمونه به هر دو چاهک مربوط به نمونه (اعم از چاهک مربوط به تست اسید فسفاتاز و چاهک بلانک نمونه) اضافه کنید و با حرکت دورانی پلیت، مخلوط نمایید.
۳. به میزان ۵۰ میکرولیتر از بافر رنگ‌زا به چاهک مربوط به تست اسید فسفاتاز (به چاهک بلانک نمونه اضافه نکنید) و چاهک بلانک بافر رنگ‌زا اضافه کنید و با حرکت دورانی پلیت، مخلوط نمایید و به مدت ۱۵ دقیقه در دمای ۳۷ درجه سانتی‌گراد انکوبه کنید.
۴. به میزان ۵۰ میکرولیتر از بافر متوقف‌کننده به تمام چاهک‌ها اضافه کرده و بلافاصله در طول ۴۰۵ نانومتر اقدام به خوانش نتایج کنید.

محاسبات: برای محاسبه فعالیت اسید فسفاتاز از فرمول زیر استفاده کنید:

$$Acid\ Phosphatase\ (U/mL) = \frac{\Delta A405 \times Total\ volume \times 1000}{18000 \times t \times V\ sample}$$

در این فرمول حجم کل (Total volume) برابر با ۰/۲۵۰ میلی لیتر، زمان واکنش (t) ۱۰ دقیقه و حجم نمونه ۰/۰۵ میلی لیتر می‌باشد. عدد ۱۸۰۰۰ هم ضریب خاموشی بافر رنگ‌زا در طول موج ۴۰۵ نانومتر است. عدد ۱۰۰۰ هم برای تبدیل واحد بوده و $\Delta A405$ هم تفاوت جذب بلانک اصلی با تفاوت جذب نمونه و بلانک نمونه میباشد.

$\Delta A405$: (A Sample test – A Sample blank) - A Blank

برای ساده سازی فرمول، تفاوت جذب‌ها در نهایت باید در عدد ضرب شده تا فعالیت آنزیم بر حسب U/mL محاسبه گردد.

$$Acid\ Phosphatase\ (U/mL) = \Delta A405 \times 0.0278$$

با توجه به اینکه عدد بر حسب واحد U/mL یک عدد کوچک با اعداد اعشاری زیاد است. بنابراین می‌توان با فرمول زیر بر حسب mU/mL محاسبات را انجام داد:

$$Acid\ Phosphatase\ (mU/mL) = \Delta A405 \times 27.8$$

دقت داشته باشید برای نرمالایز کردن داده‌ها باید میزان توتال پروتئین را هم اندازه‌گیری کنید و نتایج به دست آمده از تست را بر توتال پروتئین تقسیم کرده و داده‌ها را به صورت $U/\mu g$ (mU/ μg) یا U/mg (mU/mg) گزارش کنید.

دقت نمایید در حالت طبیعی فعالیت آنزیم اسید فسفاتاز در نمونه سرم بسیار کم است و فقط در موارد پاتولوژیک با آزاد سازی این آنزیم از بافت به سرم فعالیت قابل توجهی در سرم دارد. در موارد استفاده از بافت حتماً ابتدا با تعیین رقت، رقت مناسب به دست آورید به گونه‌ای که خوانش در حد آستانه خوانش توسط کیت قرار بگیرد. بهترین رقت، رقتی است که با OD نهایی برابر ۱/۵-۱ باشد.

برای سهولت محاسبه داده‌ها، فایل ایکسل طراحی شده توسط کمپانی KPG را از بارکد زیر دانلود کنید:



نکات مهم

کیت را در دمای ۲ تا ۸ درجه سانتی‌گراد نگهداری کنید و ۳۰ دقیقه قبل از آزمایش به دمای محیط برسانید.

از جایگزینی مواد کیت با سایر مواد خودداری کنید.

رعایت اصول ایمنی آزمایشگاهی الزامی است.

کارمانیا پارس ژن تولید کننده کیت‌های:

۱. الایزا برای اندازه‌گیری سایتوکین‌ها
۲. استخراج DNA و RNA به روش‌های ستونی، رسوبی و نانوذرات مگنت
۳. اندازه‌گیری اکسیدان و آنتی اکسیدان‌ها
۴. انواع پروتئین‌های نوترکیب (سایتوکین‌ها و کموکین‌ها)
۵. اندازه‌گیری miRNA
۶. محصولات مرتبط با کشت سلول مانند FBS، محیط کشت و سلول‌های سرطانی و بنیادی مزانشیمال
۷. میکروتیوب‌ها دستگاه‌های Real-Time PCR
۸. ستون‌های تخلیص DNA و RNA
۹. محیط کشت (RPMI (Gibco
۱۰. محیط کشت (DMEM/F12 (Gibco
۱۱. Amphotricin
۱۲. Fetal Bovine serum
۱۳. MTT assay Kit
۱۴. مستر میکس PCR
۱۵. کیت سنتز cDNA
۱۶. آنزیم‌های مولکولی (Klen-Taq DNA Polymerase (Reverse Transcriptase