

کیت سنجش پراکسید هیدروژن (H₂O₂) CN. KPG-H₂O₂

کیت اندازه گیری (TMB/HRP) H₂O₂ برای سنجش کمی غلظت پراکسید هیدروژن در نمونه های بیولوژیکی (مانند سرم، پلاسما، ادرار، عصاره بافت و محیط کشت سلولی)، نمونه های محیطی (آب و پساب) و نمونه های صنعتی (محصولات غذایی و دارویی) طراحی شده است. این کیت شامل تمام معرف های لازم برای انجام آزمایش به صورت آماده و استاندارد است و نتایج آن با دقت و تکرارپذیری بالا در آزمایشگاه های تحقیقاتی و بالینی قابل استفاده است. در این کیت، آنزیم HRP (پراکسیداز ترپ کوهی) واکنش اکسایش TMB توسط H₂O₂ را کاتالیز می کند. محصول اکسید شده TMB دارای رنگ آبی است که پس از افزودن اسید (مانند اسید سولفوریک ۱ مولار) به رنگ زرد پایدار تغییر می یابد. شدت رنگ زرد تولید شده (جذب در طول موج ۴۵۰ نانومتر) با غلظت H₂O₂ در نمونه نسبت مستقیم دارد. با استفاده از یک منحنی استاندارد، غلظت H₂O₂ در نمونه های مجهول محاسبه می شود.

محتویات کیت:

۱. بافر رقیق کننده (Dilution buffer) (KPG-DwH₂O₂)
 ۲. بافر بلانک (Blank Buffer) (KPG-CitMet)
 ۳. سوبسترا (KPG-TMB) (H₂O₂ Substrate)
 ۴. آنزیم HRP (HRP Enzyme) (KPG-HRP)
 ۵. بافر رقیق کننده HRP (Dilution buffer) (KPG-HRPD)
 ۶. استاندارد (KPG-StdH₂O₂) (H₂O₂ Standard)
 ۷. بافر متوقف کننده (KPG-Stp) (Stopping Buffer)
 ۸. پلیت الایزا: ۲ عدد در ۹۶ تستی (یک عدد در ۴۸ تستی)
- دقت نمایندید تمامی محتوای کیت باید در دمای ۴-۸ درجه سانتیگراد نگهداری شوند.

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

آماده سازی محلول ها:

بافر رقیق کننده، بافر بلانک و بافر متوقف کننده آماده به کار بوده و نیاز به آماده سازی ندارند. برای آماده سازی آنزیم HRP (KPG-HRP)، به میزان ۵ میکرولیتر از آنزیم را در ۵۰۰ میکرولیتر بافر رقیق کننده HRP (KPG-HRPD) رقیق کنید. دقت نمایندید آنزیم رقیق شده به مدت یک هفته پایداری دارد، بنابراین به اندازه نیاز بایستی رقیق سازی انجام شود. برای آماده سازی سوبسترا، بایستی ۵۰۰ میکرولیتر از آنزیم آماده شده را به ۵ میلی لیتر از سوبسترا اضافه کنید. دقت نمایندید این ترکیب تنها ۵ ساعت پایداری دارد، بنابراین به میزان مورد نیاز تهیه بفرمایید.

آماده سازی استاندارد ها:

برای آماده سازی استاندارد، به میزان ۱۰ میکرولیتر از استاندارد را در ۱۰ میلی لیتر بافر رقیق کننده (Dilution buffer) رقیق کنید و در ادامه از این محلول رقیق شده به میزان ۵۰ میکرولیتر به ۹۵۰ میکرولیتر از بافر رقیق کننده (Dilution buffer) اضافه کنید تا غلظت ۵۰۰ میکرومول بر لیتر (استاندارد شماره ۱) از استاندارد آماده شود. در ادامه، طبق جدول زیر باقی استاندارد ها را آماده نمایندید:

Std	غلظت	بافر رقیق کننده	غلظت
2	250 µM/L	250 µL	250 µL
3	125 µM/L	375 µL	125 µL
4	62.5 µM/L	437.5 µL	62.5 µL
5	31.25 µM/L	468 µL	31 µL
6	15.62 µM/L	484.5 µL	15.5 µL

آماده سازی نمونه:

تذکر مهم: نمونه ها باید بلافاصله پس از جمع آوری بررسی شوند یا در دمای ۸۰- درجه سانتیگراد نگهداری گردند. از تکرار سیکل های انجماد و ذوب خودداری کنید.

۱. **نمونه های مایع** (سرم، پلاسما، ادرار): نمونه سرم و پلاسما بایستی به نسبت یک سوم با بافر رقیق کننده (Dilution buffer) رقیق شوند یعنی ۲۵ میکرولیتر از نمونه با ۵۰ میکرولیتر از بافر رقیق کننده (Dilution buffer) مخلوط کنید. نمونه ادرار نیاز به رقت سازی ندارد اما در صورتیکه تست بلانک (۲۵ میکرولیتر نمونه را با ۵۰ میکرولیتر بافر بلانک مخلوط و در OD: 450 خوانش کنید) ادرار از OD: 0.5 بیشتر باشد بایستی رقیق سازی یک دوم و یا یک سوم انجام شود.

۲. **نمونه های بافت:** حدود ۲۰-۵۰ میلی گرم بافت را در ۵۰۰ میکرولیتر بافر رقیق کننده سرد هموژن 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 مایع رویی را به نسبت یک پنجم (۲۰ میکرولیتر نمونه با ۸۰ میکرولیتر بافر رقیق کننده (Dilution buffer)) رقیق کنید. دقت نمایندید در صورتیکه نمونه با این رقت در چاهک بلانک نمونه دارای OD بیش از ۰/۶ باشد، بایستی نمونه را بیشتر رقیق کرد. به همین منظور ابتدا تست بلانک نمونه را (۲۵ میکرولیتر نمونه را با ۵۰ میکرولیتر بافر بلانک مخلوط و در OD: 450 خوانش کنید) انجام داده سپس تست اصلی را انجام دهید. در واقع بررسی یک نمونه برای این امر کفایت می کند. در صورتیکه میزان H₂O₂ در نمونه زیاد باشد نیز باید رقیق سازی بیشتری انجام شود. به این منظور یک تست کامل را بر روی نمونه انجام دهید در صورتیکه OD از ۲ بیشتر باشد نمونه رقیق تر شود تا به حدود ۱/۲ تا ۱/۵ برسد.

۳. **نمونه های کشت سلولی:** از سوپرناتانت کشت سلول استفاده نکنید. سلول ها را جمع آوری کرده، با PBS شستشو دهید و سپس در بافر RIPA مخصوص تست های 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. اما در صورتیکه تست بلانک (۲۵ میکرولیتر نمونه را با ۵۰ میکرولیتر بافر بلانک مخلوط و در OD: 450 خوانش کنید) از OD: 0.5 بیشتر باشد بایستی رقیق سازی یک دوم و یا یک سوم انجام شود.

روش انجام تست:

۱. برای هر نمونه دو چاهک در نظر بگیرید به یکی از چاهک ها (چاهک تست نمونه) به میزان ۵۵ میکرولیتر از سوبسترا آماده شده (مخلوط سوبسترا و آنزیم) و به چاهک دیگر (چاهک بلانک نمونه) ۵۵ میکرولیتر از بافر بلانک اضافه نمایید. یک چاهک هم برای بلانک سوبسترا در نظر بگیرید و به آن ۵۵ میکرولیتر از سوبسترا آماده شده (مخلوط سوبسترا و آنزیم) اضافه نمایید. برای استاندارد ها هم (شش چاهک) به میزان ۵۵ میکرولیتر از سوبسترا آماده شده (مخلوط سوبسترا و آنزیم) به چاهک ها اضافه کنید.

۲. به چاهک های تست و بلانک نمونه، ۲۵ میکرولیتر از نمونه اضافه کنید و به چاهک بلانک سوبسترا به میزان ۲۵ میکرولیتر از بافر بلانک و به چاهک های استاندارد ها ۲۵ میکرولیتر از استاندارد ها اضافه نمایید.

۳. به منظور مخلوط شدن محتوای چاهک ها، پلیت را با دست و حرکت دورانی حرکت داده و در دمای ۳۷ درجه سانتیگراد به مدت ۲۰ دقیقه انکوبه کنید و در ادامه به تمامی چاهک ها ۲۵ میکرولیتر از بافر متوقف کننده اضافه کرده و بعد از مخلوط کردن محتوا، در طول موج ۴۵۰ نانومتر خوانش کنید.

	چاهک استاندارد	چاهک تست	چاهک بلانک نمونه	چاهک بلانک سوبسترا
سوبسترا آماده شده (مخلوط سوبسترا و آنزیم)	۵۵ میکرولیتر	۵۵ میکرولیتر	-	۵۵ میکرولیتر
بافر بلانک	-	-	۵۵ میکرولیتر	۲۵ میکرولیتر
نمونه	-	۲۵ میکرولیتر	۲۵ میکرولیتر	-
استاندارد	۲۵ میکرولیتر	-	-	-
انکوباسیون در ۳۷ درجه سانتیگراد	۲۰ دقیقه	۲۰ دقیقه	۲۰ دقیقه	۲۰ دقیقه
بافر متوقف کننده	۲۵ میکرولیتر	۲۵ میکرولیتر	۲۵ میکرولیتر	۲۵ میکرولیتر
خوانش در ۴۵۰ نانومتر	+	+	+	+

برای گزارش نهایی بایستی مقادیر به دست آمده در چاهک های بلانک نمونه (هر نمونه به صورت جداگانه) را با بلانک سوبسترا جمع کرده و این عدد را از غلظت تست کم کرد:

غلظت نهایی (میکرومول بر لیتر): مقادیر در چاهک تست - (مقادیر در چاهک بلانک نمونه + مقادیر در چاهک بلانک سوبسترا)

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 (گلوتاتیون اکسید شده)
۱۸. کیت سنجش میزان واحدهای تیول آزاد (گلوتاتیون احیا)
۱۹. کیت سنجش فعالیت آرژیناز

۲۰. کیت سنجش وضعیت آنتی اکسیدان ها با روش DPPH
۲۱. کیت سنجش وضعیت آنتی اکسیدان ها با روش ABTS
۲۲. کیت سنجش وضعیت آنتی اکسیدان ها با روش CUPRAC
۲۳. کیت اندازه گیری محصولات پراکسیداسیون (AOPP)
۲۴. کیت سنجش میزان کربونیل پروتئین پراکسیداز شیر
۲۵. کیت سنجش میزان توتال اکسیدان ها (TOS)

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
۵. میکروآرایه ها دستگاه های Real-Time PCR

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

۰۹۱۲۲۹۲۶۱۱۳

WWW.KARMANIAPARSGEN.IR
karmaniaparsgene@gmail.com