



## کیت اندازه گیری فعالیت وضعیت تام اکسیدانی

Total Oxidant Status (TOS) Assay Kit CN. KPG-TOS

گونه‌های فعال اکسیژن و نیتروژن در جریان فرآیندهای متابولیکی و فیزیولوژیکی بدن تولید می‌شوند. این ترکیبات می‌توانند واکنش‌های اکسیداتیو مضر ایجاد کنند که بر ارگانسیم‌های دخیل در مکانسیم‌های آنتی‌اکسیدانی (آنزیمی و غیرآنزیمی) تأثیر منفی بگذارند. در شرایط خاص، زمانی که سطح اکسیدان‌ها افزایش می‌یابد و میزان آنتی‌اکسیدان‌ها کاهش پیدا می‌کند، سیستم دفاعی بدن قادر به جلوگیری از آسیب‌های اکسیداتیو نبوده و در نتیجه، اختلالات گسترده‌ای در عملکرد بدن پدید می‌آید.

غلظت سرمی (یا پلاسمایی) گونه‌های مختلف اکسیدان را می‌توان به‌طور جداگانه اندازه‌گیری کرد، اما این روش‌های سنجش معمولاً زمان‌بر، پرهزینه و پرزحمت هستند و به تکنیک‌های پیچیده آزمایشگاهی نیاز دارند. از آنجا که ارزیابی تک‌تک مولکول‌های اکسیدان به‌صورت مجزا عملی نیست و اثرات اکسیداتیو آنها نیز به‌صورت تجمعی است، از شاخصی به نام وضعیت کلی اکسیدان‌ها (TOS) استفاده می‌شود. این شاخص، میزان کل پراکسیدها و فعالیت اکسیداتیو موجود در نمونه را به‌صورت یکجا اندازه‌گیری می‌کند و به‌عنوان معیاری برای ارزیابی استرس اکسیداتیو به‌کار می‌رود.

کیت حاضر به دلیل استفاده از تک محلول آماده به کار، در میان سایر کیت‌های موجود در بازار از سادگی و سهولت کار بسیار بالایی برخوردار است. کیت سنجش فعالیت وضعیت تام اکسیدانی تولیدی شرکت کارمانیا پارس ژن، روشی استاندارد، قابل اطمینان و ساده برای ارزیابی وضعیت تام اکسیدانی در نمونه‌های زیستی نظیر سرم، پلاسما، ادرار، بافت و لیزات سلولی ارائه می‌دهد.

### محتویات کیت:

۱. معرف وضعیت تام اکسیدانی (Reagent TOS) (KPG-RTOS)
۲. بافر رقیق کننده معرف (TOS Dilution Buffer) (KPG-PBSS2/7)
۳. بافر رقیق کننده استاندارد (Standard Dillution buffer) (KPG-PBSS6)
۴. استاندارد وضعیت تام اکسیدانی (TOS Standard) (KPG-TOSST)
۵. پلیت الایزا

موارد مورد نیاز که در کیت موجود نیست: سمپلر و سر سمپلر، الایزا ریدر حاوی طول موج ۵۶۰ نانومتر

### آماده سازی محلول‌ها:

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 پایدار 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:

در مواردی که از سرم، پلاسما یا ادرار استفاده می‌کنید نیازی به رقیق سازی نمونه نیست اما در صورتیکه در نهایت میزان TOS در نمونه زیاد باشد رنگ نهایی به جای بنفش به سمت خاکستری پیش می‌رود بنابراین در این موارد باید نمونه رقیق شود (معمولاً یک دوم). در مواردی که نمونه بافت می‌باشد، ابتدا ۵۰ میلی گرم از بافت را در ۵۰۰ میکرولیتر بافر رقیق کننده استاندارد کاملاً هموزن 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 (مثلاً ۲۰ میکرولیتر نمونه با ۸۰ میکرولیتر بافر رقیق کننده استاندارد) با بافر رقیق کننده استاندارد رقیق کرده و سپس در تست استفاده کنید. دقت نمایید در صورتیکه در نهایت میزان OD نمونه از استاندارد ۴۲۰۰۰  $\mu\text{mol H}_2\text{O}_2 \text{ Equiv/L}$  بیشتر شد، باید نمونه را بیشتر رقیق نمایید. از نمونه سوپرناتانت کشت سلول به دلیل داشتن معرف‌های رنگی حساس به Ph استفاده نکنید بلکه نمونه سلول را بایستی ابتدا از محیط جمع‌آوری کرد سپس با PBS شستشو داد و سپس در بافر رپا مخصوص تست‌های 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 غوطه‌ور شده در بافر رپا را به تعداد ۱۰ مرتبه فریز و ذوب کنید و در هر بار به شدت مخلوط کنید.

### آماده سازی استاندارد:

به ویال حاوی استاندارد ۵ سی سی بافر رقیق کننده استاندارد اضافه کنید و خوب مخلوط کنید. در این حالت ۴۲۰۰۰ میکرومولار بر لیتر ( $\mu\text{mol H}_2\text{O}_2 \text{ Equiv/L}$ ) از محلول استاندارد آماده شده است. برای ساخت محلول‌های ۱۴۰۰، ۴۶۲۰ و ۱۵۴۰ میکرومولار بر لیتر، باید طبق جدول زیر عمل کنید. استاندارد کیت به مدت ۱ ماه در دمای محیط پایدار دارد.

| استاندارد ۴۲۰۰۰ میکرومولار بر لیتر | بافر رقیق کننده استاندارد | غلظت نهایی                                              |
|------------------------------------|---------------------------|---------------------------------------------------------|
| 600 $\mu\text{L}$                  | 0 $\mu\text{L}$           | 42000 ( $\mu\text{mol H}_2\text{O}_2 \text{ Equiv/L}$ ) |
| 200 $\mu\text{L}$                  | 400 $\mu\text{L}$         | 14000 ( $\mu\text{mol H}_2\text{O}_2 \text{ Equiv/L}$ ) |
| 66 $\mu\text{L}$                   | 534 $\mu\text{L}$         | 4620 ( $\mu\text{mol H}_2\text{O}_2 \text{ Equiv/L}$ )  |
| 22 $\mu\text{L}$                   | 578 $\mu\text{L}$         | 1540 ( $\mu\text{mol H}_2\text{O}_2 \text{ Equiv/L}$ )  |

### 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 و ۱۰ میکرولیتر از هر یک از استانداردها را به میکروتیوب‌های مناسب (به طور مثال میکروتیوب ۱/۵ سی سی) اضافه کنید. به یکی از میکروتیوب‌ها ۱۰ میکرولیتر بافر رقیق کننده استاندارد به عنوان بلانک اضافه کنید.
  ۳. به میزان ۴۰۰ میکرولیتر معرف وضعیت تام اکسیدانی به تمام میکروتیوب‌ها اضافه کنید و به خوبی مخلوط کنید. دقت نمایید ابتدا معرف را به میکروتیوب نمونه‌ها و سپس به میکروتیوب مربوط به استاندارد‌ها و بلانک اضافه کنید.
  ۴. میکروتیوب‌ها را مخلوط و در دمای محیط به مدت ۴ دقیقه انکوبه کرده و در ادامه ۲۰۰ میکرولیتر از محلول نهایی را به پلیت الایزا منتقل و در طول موج ۵۶۰ نانومتر اندازه‌گیری کنید. دقت نمایید تبدیل رنگ نارنجی به بنفش نشان دهنده انجام واکنش است.
- محاسبات: داده‌ها را بر طبق منحنی استاندارد و بر اساس میکرومولار بر لیتر ( $\mu\text{mol H}_2\text{O}_2 \text{ Equiv/L}$ ) گزارش کنید.

برای محاسبه میزان وضعیت تام اکسیدانی بر حسب میلی گرم پروتئین، نیاز به اندازه‌گیری میزان تام پروتئین (توتال پروتئین) در نمونه دارید. ما کیت اندازه‌گیری توتال پروتئین کارمانیا پارس ژن را پیشنهاد می‌دهیم چون بر اساس تکنولوژی BCA است و از روش برادفورد حساسیت بسیار بالاتری دارد. در صورت محاسبه میزان پروتئین تام، داده به دست آمده را بر میزان تام پروتئین تقسیم کرده و داده را به صورت میکرومولار بر میلی گرم ( $\mu\text{mol H}_2\text{O}_2 \text{ Equiv/mg}$ ) گزارش نمایید.

**دستورالعمل‌های ایمنی:** محلول‌های 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.

کیت‌های مشابه در حیطة اکسیدان‌ها و آنتی اکسیدان‌ها تولیدی کارمانیا پارس ژن:

۱. کیت بررسی فعالیت تام آنتی اکسیدانی (FRAP; TAC)
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 اندازه‌گیری توتال پروتئین
۹. کیت بررسی فعالیت میلوپراکسیداز

کارمانیا پارس ژن تولید کننده کیت‌های:

۱. الایزا برای اندازه‌گیری سابتوکین‌ها
۲. استخراج DNA و RNA به روش‌های ستونی، رسوبی و نانوذرات مغنت
۳. اندازه‌گیری miRNA
۴. محصولات مرتبط با کشت سلول مانند FBS، محیط کشت و سلول‌های سرطانی و بنیادی مزانشیما
۵. میکروتیوب‌ها دستگاه‌های Real-Time PCR
۶. ستون‌های تخلیصی DNA و RNA

با ما در تماس باشید

WWW.KARMANIAPARSGEN.IR ۰۹۱۳۲۹۲۶۱۱۳



## Total Oxidant Status (TOS) Assay Kit

### CN. KPG-TOS

Reactive oxygen and nitrogen species are produced during metabolic and physiological processes in the body. These compounds can cause harmful oxidative reactions that negatively affect organisms involved in antioxidant mechanisms (enzymatic and non-enzymatic). In certain circumstances, when the level of oxidants increases and the amount of antioxidants decreases, the body's defense system is unable to prevent oxidative damage, resulting in widespread disruptions in body function. Serum (or plasma) concentrations of different oxidant species can be measured separately, but these assay methods are usually time-consuming, expensive, and laborious, requiring complex laboratory techniques. Since it is not practical to evaluate individual oxidant molecules separately and their oxidative effects are cumulative, an index called total oxidant status (TOS) is used. This index measures the total amount of peroxides and oxidative activity present in the sample simultaneously and is used as a criterion for assessing oxidative stress. Due to the use of a single ready-to-use solution, this kit is very simple and easy to use compared to other kits on the market. The Total Oxidant Status Activity Measurement Kit produced by Karmania Pars Gene Company provides a standard, reliable, and simple method for assessing the total oxidant status in biological samples such as serum, plasma, urine, tissue, and cell lysates.

#### • Kit components:

1. Reagent TOS (KPG-RTOS)
2. TOS Dilution Buffer (KPG-PBSS2/7)
3. Standard Dilution buffer (KPG-PBSS6)
4. TOS Standard (KPG-TOSST)
5. ELISA Plate

#### Required items that are not included in the kit:

1. Sampler and sampler head
2. Centrifuge
3. ELISA reader containing a wavelength of 560 nm

Contact us  
+989132926113

WWW.KARMANIAPARSGEN.IR  
karmaniaparsgene@gmail.com

#### Preparation of solutions:

The total oxidant status reagent is in powder form and must be added to 50 ml of reagent dilution buffer in the 96-test kit (25 cc in the 48-test kit). The reagent is stable at room temperature for one hour. Therefore, prepare the reagent when needed and use the kit in less than one hour. If the reagent is stored in a fully oxidized state after testing, the color of the reagent will change over time and become purple. If needed again, first add concentrated HCL acid to the reagent until the reagent turns orange and then use again. Note that in this case, the sensitivity of the kit will decrease.

#### Sample preparation:

In cases where you use serum, plasma, or urine, there is no need to dilute the sample, but if the TOS level in the sample is high, the final color will turn gray instead of purple, so in these cases the sample must be diluted (usually one-half). In cases where the sample is tissue, first homogenize 50 mg of tissue in 500  $\mu$ l of standard dilution buffer (this should be done at cold temperature, for example, cool the dilution buffer by incubating it in the refrigerator for one hour) and then centrifuge at 10,000 RPM for 10 minutes. Finally, dilute the supernatant to one-fifth (e.g., 20  $\mu$ l of sample with 80  $\mu$ l of standard dilution buffer) with standard dilution buffer and then use in the test. Note that if the OD of the sample ultimately exceeds the standard of 42000  $\mu$ mol H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> Equiv/L, the sample must be diluted further. Do not use the cell culture supernatant because it contains pH-sensitive color indicators. Instead, you must 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 assays (you can obtain this from Karmania Pars Gene) using a sonicator. Centrifuge the cell lysate and use the supernatant for the assay. Please note that if you do not have a sonicator, you can subject the cell sample immersed in RIPA buffer to 10 cycles of freeze-thawing, with vigorous mixing each time.

#### Standard Preparation:

Add 5 cc of Standard Dilution Buffer to the vial containing the standard and mix well. This will prepare a 42000  $\mu$ mol H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> Equiv/L standard solution. To prepare 14000, 4620, and 1540  $\mu$ M/L solutions, follow the table below. The kit standard is stable for 1 month at room temperature.

| Final concentration                                      | Standard Dilution buffer | 42000 $\mu$ mol H <sub>2</sub> O <sub>2</sub> Equiv/L standard |
|----------------------------------------------------------|--------------------------|----------------------------------------------------------------|
| 42000 ( $\mu$ mol H <sub>2</sub> O <sub>2</sub> Equiv/L) | 0 $\mu$ L                | 600 $\mu$ L                                                    |
| 14000 ( $\mu$ mol H <sub>2</sub> O <sub>2</sub> Equiv/L) | 400 $\mu$ L              | 200 $\mu$ L                                                    |
| 4620 ( $\mu$ mol H <sub>2</sub> O <sub>2</sub> Equiv/L)  | 534 $\mu$ L              | 66 $\mu$ L                                                     |
| 1540 ( $\mu$ mol H <sub>2</sub> O <sub>2</sub> Equiv/L)  | 578 $\mu$ L              | 22 $\mu$ L                                                     |

#### Test Procedure:

1. Before starting the test, keep the kit components at room temperature for 20 minutes.
2. Add 10  $\mu$ L of the sample and 10  $\mu$ L of each of the standards to appropriate microtubes (e.g. 1.5 cc microtubes). Add 10  $\mu$ L of standard dilution buffer to one of the microtubes as a blank.
3. Add 400  $\mu$ L of Total Oxidation Status Reagent to all microtubes and mix well. Be careful to add the reagent to the sample microtube first, then to the standards and blank microtubes.
4. Mix the microtubes and incubate at room temperature for 4 minutes. Then transfer 200  $\mu$ L of the final solution to the ELISA plate and measure at a wavelength of 560 nm. Note that the color change from orange to purple indicates the reaction.

**Calculations:** Report data according to the standard curve and in micromolar per liter.

To calculate the total oxidative status in milligrams of protein, you need to measure the total protein in the sample. We recommend the Carmania Pars Gene Total Protein Assay Kit because it is based on BCA technology and has much higher sensitivity than the Bradford method.

If calculating the total protein content, divide the data obtained by the total protein content and report the data as millimolar per microgram ( $\mu$ mol H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> Equiv/mg).

**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. Total Antioxidant Activity (DPPH) Testing Kit
3. Total Antioxidant Activity (ABTS) Testing Kit
4. Total Antioxidant Activity (CUPRAC) Testing Kit
5. MDA Activity Testing Kit
6. NO Level Testing Kit
7. Paraonase-1 Activity Testing Kit
8. Protein Carbonyl Level Testing Kit
9. SOD Activity Testing Kit
10. 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
4. 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