کیت سنجش ظرفیت آنتی اکسیدانتی تام

Total antioxidant capacity (TAC) Assay Kit

(ABTS Method)

(Cat-No: S1192-100 □, S1192-200 □)

الف) مقدمه

به طور کلی دو نوع سیستم آنتی اکسیدانتی وجود دارد که شامل: ۱) سیستم آنزیمی در برگیرنده آنزیم‌های سوپراکسید دیسموتاز (SOD)، کاتالاز (CAT) و گلوتاتیون پراکسیداز (GP_x)۲ سیستم غیر آنزیمی شامل اسید اوریک، ویتامین‌های C و E، گلوتاتیون، بیلی‌روبین، و آلفا لیپوئیک اسید می‌باشد. ظرفیت آنتی اکسیدانتی تام به مجموعه اثرات تمامی آنتی اکسیدانت‌های موجود در خون و مایعات بافتی اتلاق می‌شود. جهت کسب اطلاعات بیشتر در مورد سیستم آنتی اکسیدانتی به مقدمه سایر کیت های آنتی اکسیدانتی مثل کیت سنجش گلوتاتیون موجود در وبسایت مراجعه شود.

اساس سنجش

در این روش ABTS در حضور یک اکسیدانت مناسب به $ABTS^+$ سبز اکسید شده که در حضور آنتی اکسیدانت مهار می‌شود. ظرفیت آنتی اکسیدانت تام (TAC) نمونه را می‌توان با اندازه گیری جذب $ABTS^+$ در ۴۱۴ nm اندازه گیری کرد.

تعیین ظرفیت آنتی‌اکسیدانتی تام در نمونه‌های سرمی، پلاسمایی، بافت، ادرار و .... می‌باشد.

ب) محتویات کیت

	نام ماده	مقدار
۱	بافر لیز	**۱۰۰ml**
۲	ABTS 10X	**۱ ml**
۳	پتاسیم پرسولفات 10 X	**۱ ml**
۴	آنتی اکسیدانت مرجع	**۱ ml**

ج) مراحل انجام سنجش

تهیه محلول رادیکال ABTS

برای آماده‌سازی رادیکال کاتیونی ABTS مقدار ۱۰۰ µl از استوک ABTS را در ۸۰۰ µl آب دوبار تقطیر حل کرده و سپس روی آن ۱۰۰ µl از پتاسیم پرسولفات ۱۰X اضافه نمایید. پس از گذشت یک ساعت محلول حاصله که حاوی

رادیکال‌های آزاد می‌باشد به نسبت ۱:۵ با آب مقطر رقیق شده و جذب آن در طول موج ۴۱۴nm در حدود یک تنظیم شود. (در صورتی که جذب بالاتر بود رقیق‌سازی شود).

۱- آماده‌سازی استاندارد

محلول‌های استاندارد را هم می‌توان در لوله‌آزمایش و هم در میکروپلیت آماده کرد و جذب آنها را می‌توان به ترتیب توسط دستگاه‌های اسپکتروفتومتر و میکروپلیت ریدر خواند. جدول زیر برای خوانش توسط اسپکتروفتومتر تنظیم شده است. برای انجام آزمایش توسط روش میکروپلیت مقادیر ذکر شده را ۵ برابر کمتر کنید.

از محلول استاندارد ۱۰ mMغلظت‌های مختلف ۱-۰ mM مطابق جدول زیر به صورت سریالی تهیه کنید. سپس به µl ۵۰۰ از محلول کاری حاوی رادیکال $ABTS^{\cdot+}$ ، ۵۰۰ µl از نمونه‌های استاندارد افزوده شده و بعد از ۵ دقیقه جذب نمونه‌ها در طول موج ۴۱۴ nm قرائت شود.

VitC (µM)	۱۰۰۰	۵۰۰	۲۵۰	۱۲۵	۶۲/۵	۳۱/۲۵	۰
VitC (10 mM)	۲۰۰µl	۵۰۰µl از غلظت قبلی	۵۰۰µl از غلظت قبلی	۵۰۰µl از غلظت قبلی	۵۰۰µl از غلظت قبلی	۵۰۰µl از غلظت قبلی	۰
آب مقطر (µl)	۸۰۰	۵۰۰	۵۰۰	۵۰۰	۵۰۰	۵۰۰	۵۰۰
به µl ۵۰۰ از نمونه‌های استاندارد فوق µl ۵۰۰ از محلول کاری حاوی رادیکال $ABTS^{\cdot+}$ اضافه شود							

۲- آماده سازی نمونه

- نمونه‌های مایع

شامل نمونه‌هایی مثل نمونه‌های سرمی، پلاسمایی، بزاق، ادرار، مایع رویی سلولی یا سایر مایعات می‌باشند. نمونه‌های خونی باید کاملا سرم یا پلاسما از خون جداسازی شود (همولیز نشود). نمونه‌های ادرار، بزاق یا نمونه‌های مایع مستقیماً برای سنجش استفاده شوند. توصیه می‌شود که از EDTA به عنوان ضد انعقاد استفاده نشود بلکه هپارین یا سیترات سدیم استفاده شود.

- نمونه سلول

سلول‌ها را جمع آوری کنید (سلول $>10^6$) توصیه می‌شود به جای تریپسین یا EDTA از خراش دهنده استفاده شود. سپس آن را در حدود µl ۵۰۰ -۳۰۰ بافر PBS حل کرده و هموژن یا اولتراسونیک کنید تا غشا سلول‌ها کاملا تخریب شده و آنتی اکسیدانت‌های آن آزاد شود. لیزات سلول‌ها را به مدت ۱۰ دقیقه در $4^{\circ}C$ با دور ۱۰۰۰۰g سانتریفیوژ کرده و مایع رویی را برای سنجش غلظت پروتئین و TAC جمع آوری نمایید.

- نمونه بافتی

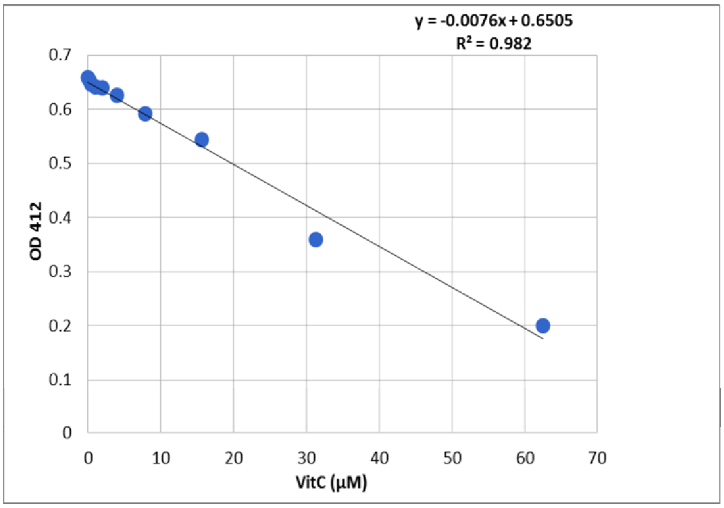
بافت را بعد از توزین دقیق با نسبت ۲۰٪ در PBS حل کرده و بطور مکانیکی در یک هاون چینی هموژن نمائید. سپس در ۱۰۰۰۰ g در ۴°C به مدت ۱۰ دقیقه سانتریفیوژ نموده و مایع رویی را جمع‌آوری شود. مقداری از آن را برای سنجش غلظت پروتئین و باقیمانده را برای سنجش TAC استفاده کنید.

۳- سنجش نمونه

برای سنجش مقدار TAC نمونه‌های مجهول کافی است ۵µl-۱۰ از آنها را با آب مقطر به حجم ۵۰۰ µl رسانده و سپس ۵۰۰ µl از محلول کاری حاوی رادیکال $ABTS^{\cdot+}$ به هر یک از آنها اضافه نمایید. بعد از ۵ دقیقه جذب نمونه‌ها در طول موج ۴۱۴ nm قرائت شود.

د) آنالیز نتایج

مقادیر جذب نمونه‌های استاندارد را در برابر غلظت آن در یک نمودار به صورت زیر ترسیم نمایید سپس معادله‌ی خط برازش (trendline) را به دست بیاورید و به کمک معادله y =ax+b مقدار x را برای نمونه مجهول بدست بیاورید.



در صورت بروز هر گونه ابهام، مشکل یا اشتباه با کارشناسان پشتیبانی فنی آرسام فرا زیست در میان بگذارید. کارشناسان ما با شماره تلفن ۰۹۱۴-۷۱-۵۷۴-۷۱ از طریق تلگرام و یا ایمیل ArsamFaraZist@gmail.com برای ارائه راهنمایی و رفع مشکل حاضر هستند.