کیت سنجش فنول تام

Nagphenol™ Total Phenol Assay Kit

مقدمه:

پلی‌فنول‌ها به دلیل تأثیرات مفید در سلامتی در تحقیقات پژوهشی بسیار حائز اهمیت هستند. آن‌ها در انواع میوه‌ها، سبزیجات، آجیل، دانه‌ها، گل‌ها، پوست، نوشیدنی‌ها و برخی از مواد غذایی تولید شده به عنوان یک جزء از مواد طبیعی نامیده می‌شوند. هم‌چنین پلی‌فنول‌ها اثرات ضد سرطان، ضد زخم، ضد التهاب، ایمن ساز، ضد میکروب و ضد درد نشان می‌دهند. این ترکیبات می‌توانند به عنوان آنتی‌اکسیدان‌ها در صنایع غذایی مورد استفاده قرار گیرند و از راه‌های مختلف به سلامت انسان کمک می‌کنند. اثرات مفید پلی‌فنول بر سلامت انسان می‌تواند به علت ویژگی‌های رادیکال‌های آزاد باشد که می‌تواند فعالیت این رادیکال‌ها را بر روی سلول‌ها متوقف کند.

سنجش فنول بر اساس روش Folin-Ciocalteu است. این روش متکی بر انتقال الکترون‌ها در محدوده قلیایی از ترکیبات فنلی است تا یک محلول آبی رنگ را بسته به غلظت ترکیبات فنلی تشکیل دهد. رنگ آبی ایجاد شده در محدوده طول موج ۶۹۰ تا ۷۱۰ نانومتر قابل تشخیص بوده و اسید گالیک به عنوان ترکیب استاندارد مرجع استفاده می‌شود و نتایج به صورت معادل اسید گالیک میلی‌گرم بر میلی‌لیتر بیان می‌شوند.

محتوای کیت:

ردیف	دمای نگهداری	نام ماده	۴۸ تست	۹۶ تست
۱	2-8 °C	**Reagent 1**	۵۰۰ میکرولیتر	۱ میلی‌لیتر
۲	2-8 °C	**Reagent 2**	۲ میلی‌لیتر	۴ میلی‌لیتر
۳	2-8 °C	**Standard Solution**	۳۰۰ میکرولیتر	۳۰۰ میکرولیتر
۴	-	**96-Well plate**	۱ عدد	۱ عدد

موارد مورد نیاز که در داخل کیت موجود نیست:

- میکروپلیت‌ریدر با قابلیت اندازه‌گیری جذب(OD) نوری ۶۳۰ نانومتر
- هموژنایزر؛ در صورت استفاده از بافت به عنوان نمونه (هموژنایزر نوند سلامت با کد محصول ۱۶۰۱۰)
- سانتریفیوژ
- بافر فسفات
- آب مقطر دیونیزه
- دستگاه سونیکاتور (در صورت استفاده از نمونه گیاهی)

مراحل انجام آزمایش:

۱) آماده‌سازی نمونه‌ها:

- نمونه‌ها تا زمان تست باید در دمای منفی ۸۰ درجه سانتی‌گراد نگهداری شوند.
- **نمونه‌های بافتی**: برای لیز از PBS سرد استفاده شود، بدین صورت که از نمونه بافتی در حدود ۵۰ تا ۱۰۰ میلی‌گرم وزن کرده و ۵۰۰ تا ۱۰۰۰ میکرولیتر PBS سرد اضافه کنید. سپس توسط هموژنایزر شیشه‌ایی (استفاده از هموژنایزر نوند سلامت با کد محصول ۱۶۰۱۰ پیشنهاد می‌گردد) نمونه مورد نظر را هموژنایز کرده و در ۱۰۰۰۰ دور به مدت ۱۰ دقیقه سانتریفیوژ کنید (نوند سلامت در این مرحله استفاده از سانتریفیوژ یخچال‌دار را توصیه می‌کند). در ادامه مایع رویی را جدا کرده و به عنوان نمونه استفاده نمائید.

Copyright © 2020 Navand Salamat. All rights reserved

- **نمونه‌های سلولی:** تعداد $۱۰^{۷}$ سلول را پس از سه بار شستشو با PBS را با یک میلی‌لیتر PBS هموژن کرده و پس از سانتریفیوژ در ۱۰۰۰۰ دور به مدت ۱۰ دقیقه ، مایع رویی را جدا کرده و به عنوان نمونه استفاده نمائید.
- **نمونه‌های بیولوژیکی شامل سرم، پلاسما و ادرار:** نیازی به آماده سازی ندارند.
- **آماده سازی نمونه‌های گیاهی:** پس از خشک کردن گیاه، میزان ۱۰ تا ۵۰ میلی‌گرم از گیاه مورد نظر را با استفاده از ۵ میلی‌لیتر متانول به مدت ۴۵ دقیقه و در دمای ۴۰ درجه سانتی‌گراد سونیکه نمایید. محلول حاصل را در ۱۰۰۰۰ دور به مدت ۱۰ دقیقه سانتریفیوژ کرده و مایع رویی را به عنوان نمونه استفاده نمائید.

۲) آماده‌سازی معرف‌ها:

نکته: نیم ساعت قبل از شروع آزمایش، معرف‌ها را به دمای اتاق (۲۰ تا ۲۴ درجه سانتیگراد) رسانده و در صورت مشاهده کریستال، به‌وسیله ورتکس، محلول را همگن کنید.

۳) آماده‌سازی محلول استاندارد:

جهت تهیه محلول‌های استاندارد مورد نیاز برای رسم منحنی، از محلول استاندارد موجود در کیت (غلظت ۱ میلی‌گرم بر میلی‌لیتر) استفاده نمایید. رقت های مختلف را بر اساس جدول زیر تهیه نمایید. سپس هر نمونه استاندارد را طبق روش کار (مرحله ۴) در آزمایش قرار داده و داده‌های حاصل از جذب نوری را در رسم نمودار استاندارد استفاده نمایید.

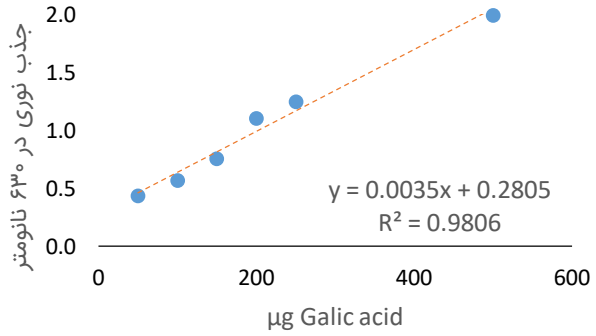
لوله (چاهک)	استاندارد میلی‌گرم/ میلی‌لیتر (میکرولیتر)	آب مقطر (میکرولیتر)	غلظت نهایی استاندارد (mg/L)
A	۰	۱۰۰	۰
B	۵	۹۵	۵۰
C	۱۰	۹۰	۱۰۰
D	۱۵	۸۵	۱۵۰
E	۲۰	۸۰	۲۰۰
F	۲۵	۷۵	۲۵۰
G	۵۰	۵۰	۵۰۰

۴) روش کار:

A. ابتدا مقدار ۸ میکرولیتر از محلول استاندارد با غلظت‌های مختلف/ نمونه به چاهک‌ها اضافه کنید.
B. مقدار ۲۴ میکرولیتر آب مقطر دیونیزه به چاهک‌های نمونه / استاندارد اضافه نموده و سپس جهت شروع واکنش مقدار ۸ میکرولیتر از Reagent 1 به چاهک‌ها اضافه کنید.
C. پلیت را به مدت ۵ دقیقه در دمای اتاق انکوبه کنید.
D. بعد از انکوباسیون مقدار ۴۰ میکرولیتر از Reagent 2 به چاهک‌های نمونه / استاندارد اضافه نمایید.
E. مقدار ۱۲۰ میکرولیتر آب مقطر دیونیزه به چاهک‌های نمونه/ استاندارد اضافه کنید.
F. در نهایت به مدت ۴۵ دقیقه در تاریکی انکوبه کرده و سپس جذب نوری نمونه / استاندارد را در طول موج ۶۳۰ نانومتر قرائت نمایید.

۵) رسم منحنی استاندارد و محاسبات:

منحنی استاندارد را با استفاده از مقدار OD استاندارد و متناظر با غلظت استاندارد به عنوان محور y و محور x به ترتیب قرار دهید. منحنی استاندارد را با نرم افزار اکسل رسم کرده و غلظت نمونه را با توجه به فرمول بر اساس مقدار *OD* نمونه محاسبه کنید.



Copyright © 2020 Navand Salamat. All rights reserved

نمودار خط برای استاندارد با غلظت‌های مختلف به صورت ذیل خواهد بود:

$$y = Ax + B$$

y : جذب نوری استاندارد

A : شیب خط (در نمودار بالا معادل ۰/۰۰۳۵ می‌باشد)

x : غلظت استاندارد (*Gallic acid*)

B : عرض از مبدا (در نمودار بالا ۰/۲۸۰۵ می‌باشد)

واحد توتال فتول: mg / ml

۵) توصیه‌ها:

- دمای واکنش برای کاهش زمان لازم برای رسیدن به حداکثر رنگ (T = 37 ºC) مورد استفاده قرار گیرد.
- به زمان‌ها و شرایط نگهداری مواد ذکر شده در پروتکل و روی جعبه توجه کنید.
- ضروری است که تمامی چاهک‌های پلیت در یک زمان مورد سنجش قرار بگیرند.
- اضافه کردن محلول کار به نمونه‌ها باید در کمترین زمان ممکن صورت بگیرد
- ممکن است یک پژوهشگر نتایج متفاوت از آزمایش مشابه به دست بیاورد. به منظور بهتر شدن نتایج، توصیه می‌شود از هر نمونه دوبار تکرار انجام گرفته و میانگین آن‌ها را به عنوان نتیجه نهایی گزارش کنید.
- قبل از شروع آزمایش، از کافی بودن مقدار نمونه‌ها و محلول‌ها اطمینان حاصل کنید.
- کیت‌های مختلف ممکن است حساسیت، محدوده تشخیص و روش کار متفاوتی داشته باشند، لذا آزمایش را دقیقا طبق روش کار مندرج در این پروتکل انجام دهید.
- محلول و مواد دیگر را جایگزین محلول و مواد داخل کیت نکرده و تنها از مواد موجود در کیت استفاده کنید.
- پس از شروع آزمایش، تمام مراحل باید بدون وقفه، کامل شود. اطمینان حاصل کنید که همه معرف‌ها، مواد و دستگاه‌ها در زمان مناسب آماده می‌شوند.
- زمان انکوباسیون نتایج را تحت تأثیر قرار خواهد داد لذا همه چاهک‌ها باید در همان ترتیب و زمان، مورد استفاده قرار گیرند.
- در زمان کار با کیت رعایت اصول ایمنی آزمایشگاهی الزامی می‌باشد.

Copyright © 2020 Navand Salamat. All rights reserved

۶) عیب‌یابی:

مشکل	احتمالات موجود	راه حل‌های پیشنهادی
عدم کارکرد سنجش یا آزمایش	سرد بودن بافرآزمایش	دمای بافر باید به دمای اتاق رسیده باشد
	عدم رعایت ترتیب مراحل آزمایش	به پروتکل موجود مراجعه کرده و دقیقا پیروی نمایید
	پلیت ریدردرطول موج نادرست	تنظیمات فیلتر دستگاه را چک نمایید
نمونه‌ها با قرائت (خوانش) نامنظم یا نامعقول	نمونه‌ها در بافرهای متفاوتی تهیه شده باشند	از بافر موجود در کیت استفاده نموده و یا به دستورالعمل موجود در پروتکل مراجعه نمایید
	نمونه‌های کشت بافت/سلول به صورت کامل هموژن نشده باشند	هموژن کردن نمونه را تکرار نمایید. مدت زمان مرحله‌ی همگن‌سازی را افزایش دهید
	استفاده از نمونه‌های چند بار دفریز شده	اگر نمونه‌ها چندین بار مورد استفاده قرار خواهند گرفت آن‌های را به دو یا سه قسمت تقسیم نمایید
	وجود ماده‌ی مداخله گر در نمونه	در صورت امکان نمونه را بیشتر رقیق نمایید
	استفاده از نمونه‌های قدیمی یا نامناسب	از نمونه‌های تازه استفاده کرده و تا زمان استفاده به درستی نگهداری شود
خوانش بالا / پایین در نمونه ها و استانداردها	دمای نامناسب ترکیبات	اجازه دهید تمام ترکیبات به دمای اتاق رسیده، سپس به آرامی ترکیب نمایید
	استفاده از کیت منقضی شده و یا نگهداری نامناسب معرف‌ها	تاریخ انقضای کیت را چک نموده و معرف ها را در شرایط مناسب نگهداری نمایید
	قرار گرفتن طولانی مدت معرف‌ها در معرض یخ	قبل از استفاده محلول واکنش تازه آماده کنید
	زمان و درجه حرارت نامناسب انکوباسیون	به پروتکل مراجعه کنید و زمان و دمای مناسب انکوباسیون را بررسی نمایید
	استفاده از حجم‌های نامناسب	از سمپلر کالیبره شده استفاده نموده و مواد را تقسیم نمایید
منحنی استاندارد غیر خطی	استفاده از ترکیبات نیمه گرم شده	قبل از آماده‌سازي محلول واکنش، همه اجزاء را به دمای مناسب رسانده سپس دوباره ترکیب نمایید
	خطاهای مرتبط با پیپت کردن در آماده سازی محلول‌های استاندارد	از حجم های بالا استفاده نمایید
	خطاهای پیپت کردن در محلول واکنش	محلول کار را هر زمان که ممکن است حاضر نمایید
	تشکیل حباب‌های هوا در چاهک‌ها	محتویات پیپت را به آرامی در چاهک ها خالی نمایید
	غلظت محلول استاندارد نادرست است	به دستورالعمل استاندارد رقت در پروتکل مراجعه کنید
	خطاهای محاسبات	بعد مراجعه به پروتکل، محاسبات را دوباره انجام دهید
نتایج غیر منتظره	نمونه‌ها در طول موج نادرست خوانده شوند	تنظیمات فیلتر و دستگاه را بررسی نمایید
	نمونه‌ها دارای محتویات مداخله گر باشند	در صورت امکان نمونه را بیشتر رقیق نمایید
	خواندن نمونه در بالا / زیر محدوده خطی	نمونه‌های غلیظ یا رقیق کرده تا خوانایی در محدوده خطی باشند

- در صورتی که در انجام هر یک از مراحل آزمایش دچار ابهام، مشکل یا اشتباه شده‌اید، نگران نباشید، تیم پشتیبانی فنی نوند سلامت در کنار شماست. کافی است به شماره تلفن ۰۹۰۱۴۱۱۴۰۹۷ از طریق واتساپ/تلگرام پیام دهید. کارشناسان ما برای رفع مشکل با شما تماس خواهند گرفت.
- نظرات و پیشنهادات مشتریان، همواره پله‌های پیشرفت و بهبود کیفیت را در نوند سلامت تشکیل می‌دهند. لذا در صورت وجود هرگونه نظر، انتقاد یا پیشنهاد، لطفا آن را از طریق ایمیل hi@navandsalamat.com با ما در میان بگذارید.

Copyright © 2020 Navand Salamat. All rights reserved