کیت سنجش سوپراکسید دیسموتاز در اریتروسیت
Erythro-Nasdox™

(Superoxide Dismutase Assay Kit for Erythrocyte Samples)

مقدمه:

گونه‌های فعال اکسیژن (ROS=Reactive Oxygen Species) که شامل مولکول‌های فعال واجد اکسیژن هستند، از ترکیبات اکسیدکننده‌ی رایج محسوب شده و با حمله به مولکول‌های مختلف، ضمن اکسید کردن آن‌ها محصولات اکسید شده‌ی ثانویه نیز تولید می‌کنند. یکی از مهم‌ترین مکانیسم‌های آنتی‌اکسیدانی بدن در برابر حمله‌ی گونه‌های فعال اکسیژن، حضور و فعالیت آنزیم سوپراکسید دیسموتاز (SOD) است.

آنزیم‌های سوپراکسید دیسموتاز متالوپروتیین هستند. این دسته از آنزیم‌ها واکنش دیسموتاسیون آنیون سوپراکسید (O_2^-) به اکسیژن و پراکسید هیدروژن را کاتالیز می‌کنند. دیسموتاسیون نوع خاصی از واکنش‌های ردوکس است که درآن، یک گونه همزمان دچار اکسایش و کاهش شده و دو محصول متفاوت ایجاد می‌کند.

سوپراکسید دیسموتاز به طور گسترده در گیاهان و حیوانات یافت می‌شود و غلظت بالایی در مغز، کبد، قلب، **اریتروسیت‌ها** و کلیه دارد. در انسان سه فرم سوپراکسید دیسموتاز دیده می‌شود: SOD1 در سیتوپلاسم که از نوع Cu/Zn می‌باشد، SOD2 در میتوکندری که حاوی منگنز است و SOD3 که خارج سلولی است و در فضای بینابینی بافت‌ها و همچنین در مایعات خارج سلولی مانند پلاسما، لنف و مایع سینوویال وجود دارد و از نوع Cu/Zn می‌باشد. واکنش سوپراکسید دیسموتاز بی‌نهایت سریع است و دارای عدد تبدیل $2 \times 10^9\ m^{-1}\ s^{-1}$ می‌باشد. حضور مقدار کافی از آنزیم در سلول‌ها و بافت‌ها، غلظت آنیون سوپراکسید را در سطح بسیار پایین نگه می‌دارد. فعالیت سوپراکسید دیسموتاز (SOD) حاضر در سلول و محیط‌های خارج سلولی، برای جلوگیری از بیماری‌های مرتبط با استرس اکسیداتیو، حیاتی است.

کیت سنجش سوپراکسید دیسموتاز در اریتروسیت Erythro-Nasdox™ روشی ساده، تکرارپذیر و استاندارد بوده و درنمونه‌های اریتروسیتی قابل اندازه‌گیری بوده و به طور کلی آزمایش بر اساس مهار واکنش اتواکسیداسیون پیروگالول می‌باشد. پیروگالول ماده‌ای است که در شرایط عادی در حضور هوا اکسیده می‌شود. با در دست داشتن غلظت مشخصی از این ماده نیمه‌عمر اتواکسیداسیون آن مشخص می‌شود. در این واکنش با اضافه کردن نمونه حاوی SOD با غلظت نامشخص مقدار مهار واکنش اتواکسیداسیون پیروگالول در زمان مشخص سنجیده و در مقایسه با کنترل میزان غلظت SOD در نمونه مشخص می‌شود. جهت افزایش دقت در کیت Erythro-Nasdox™، سنجش مقادیر سوپراکسید دیسموتاز بر اساس میزان هموگلوبین موجود در نمونه است.

آماده‌سازی معرف ها

1) **Reagent 1 (R1) 10x**: برای هر 10 نمونه دو میلی‌لیتر از R1 را با 18 میلی‌لیتر آب دوبار تقطیر مخلوط و pH را به 8/2 برسانید (توصیه نوند سلامت به استفاده از NaOH بدین منظور است).
2) **Reagent 2 (R2)**: برای هر 10 نمونه، 50 میکرولیتر از R2a را با 4950 میکرولیتر از معرف R2b مخلوط و به صورت کامل ورتکس نمایید (pH باید در موقع استفاده 7/4 باشد).
3) **بافر لیز کننده Buffer 10x**: این بافر صرفا برای آماده سازی نمونه‌های بافتی و یا سلولی کاربرد دارد. بافر لیزکننده را در ابتدا 10 برابر رقیق نمایید (یک میلی‌لیتر را با 9 میلی‌لیتر آب دوبارتقطیر مخلوط و ورتکس نمایید).

روش انجام

اندازه‌گیری هموگلوبین:

در ابتدا باید گلبولهای قرمز را از نمونه خون کامل به واسطه شستشو با نرمال سالین جدا نمایید. به این منظور، نمونه خون حاوی ماده ضد انعقاد را در 3000 دور به مدت 5 دقیقه سانتریفیوژ نموده و سپس مایع رویی(پلاسما) را جدا نمایید. سپس 3 تا 5 برابر حجم آن نرمال سالین اضافه کنید و در 3000 دور به مدت 5 دقیقه سانتریفیوژ نمایید. عمل شستشو با نرمال سالین را حداقل 3 مرتبه تکرار کرده و در مرحله آخر از اریتروسیت‌های ته نشین شده به عنوان نمونه استفاده نمایید.

برای اندازه‌گیری هموگلوبین، نمونه‌های خونی لیز شده و هموگلوبین آزاد می‌شود که توسط فروسیانید به مت هموگلوبین و در ادامه‌ی فرآیند توسط KCN به سیانومت هموگلوبین تبدیل می‌شود. این ترکیب پایدار بوده و جذب نوری آن در طول موج 546 نانومتر قابل اندازه‌گیری است.

برای سنجش میزان هموگلوبین، به ازای هر 20 نمونه، 1 میلی‌لیتر از محلول Hb a را با 1 میلی‌لیتر از محلول Hb b مخلوط و با آب مقطر به حجم 50 میلی‌لیتر رسانده و به عنوان محلول درابکین در روش کار از آن استفاده نمایید (پایداری این محلول در دمای اتاق تا 3 ماه است).

برای ترسیم منحنی استاندارد هموگلوبین، محلول استاندارد (Hb SD) را به دمای اتاق برسانید و سپس با استفاده از 5 لوله، به ترتیب زیر غلظت‌های مختلف محلول استاندارد را تهیه نمایید:

شماره لوله	استاندارد	محلول درابکین	ارزش استاندارد (g/dl)
1	صفر	2/5 میلی‌لیتر	(صفر- محلول بلانک)
2	1 میلی‌لیتر	1/5 میلی‌لیتر	8
3	1/5 میلی‌لیتر	1 میلی‌لیتر	12
4	2 میلی‌لیتر	0/5 میلی‌لیتر	16
5	2/5 میلی‌لیتر	صفر	20

برای اندازه‌گیری هموگلوبین در نمونه‌ها، 10 میکرولیتر از اریتروسیت‌های جدا شده را با 2/5 میلی‌لیتر از محلول درابکین (Hb a + Hb b+ DW) مخلوط کرده، 5 دقیقه بعد از انکوباسیون در دمای اتاق، جذب آن را در طول موج 546 نانومتر اندازه‌گیری نموده و با استفاده از منحنی استاندارد میزان هموگلوبین (g/dl) را محاسبه نمایید.

آماده‌سازی نمونه‌ها:

برای سنجش آنزیم سوپراکسید دیسموتاز در اریتروسیت‌ها، در ابتدا گلبولهای قرمز جدا شده را با استفاده از آب مقطر 1 به 100 رقیق نمایید (مثال: 10 میکرولیتر از اریتروسیت ها را با 990 میکرولیتر آب مقطر رقیق کنید) و در جدول زیر به عنوان نمونه استفاده نمایید.

توجه داشته باشید که فاکتور رقت را در فرمول و محاسبات لحاظ کنید.

برای انجام کار به ترتیب جدول زیر اقدام نمایید:

معرف	لوله نمونه (میکرولیتر)	لوله کنترل (میکرولیتر)
نمونه (اریتروسیت های رقیق شده)	**500**	**صفر**
معرف یک (R1)	**2000**	**2000**
آب دیونیزه (DW)	**صفر**	**500**
معرف بعدی را باید در داخل اسپکتروفتومتر اضافه نموده و زمان‌ها را مد نظر داشته باشید		
معرف دو (R2)	**500**	**500**
خوانش در طول موج 420 نانومتر		

اختلاف جذب نوری نمونه و کنترل را در زمان صفر، دقیقه 1، دقیقه 2 و دقیقه 3 قرائت و میانگین اختلاف آنها را به عنوان ΔOD در فرمول محاسبه استفاده نمایید.

محاسبه(1)

$$\overline{\Delta OD} = \frac{|OD_{1Min} - OD_{0Min}| + |OD_{2Min} - OD_{1Min}| + |OD_{3Min} - OD_{2Min}|}{3}$$

محاسبه (2)

$$SOD\ activity\ \left({}^{U}/_{mg\ Hb}\right) = \frac{\overline{\Delta OD}\ Test}{\overline{\Delta OD}\ Control} \times 200$$

توصیه‌ها:

- ✓ کیت در یخچال (دمای 2 -8 درجه سانتی‌گراد) نگهداری شود ولی معرف‌ها قبل از شروع آزمایش باید به دمای محیط (ترجیحاً دمای 25 درجه سانتی‌گراد)رسیده و قبل از استفاده ورتکس نمایید به گونه‌ایی که هیچ کریستالی در معرف‌ها دیده نشود.
- ✓ تمام محلول‌ها باید به صورت تازه (کمتر از 8 ساعت) تهیه و استفاده شوند.
- ✓ استفاده از سانتریفیوژ یخچالدار توصیه می‌شود.
- ✓ محلول درابکین باید شفاف و رنگ زرد روشن باشد. در صورت مشاهده کدورت و یا بی رنگ شدن آن را دور بریزید.

Navand Lab Kit
تلفن تماس: ۰۹۰۱۴۱۱۴۰۹۷ وبسایت: www.navandsalamat.com ایمیل: navandsalamat@gmail.com
آدرس: ارومیه، کیلومتر ۱۱ جاده سرو، پارک علم فناوری آذربایجان غربی، شرکت نوند سلامت – کدپستی: ۵۷۵۶۱۱۵۳۲۳