کیت سنجش سوپراکسید دیسموتاز

Nasdox™ (Superoxide dismutase non-enzymatic Method)

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 (-O2) 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، اریتروسیت ها 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 Nasdox™ روشی ساده، تکرارپذیر و استاندارد بوده و در نمونه‌های بیولوژیکی مانند سرم، پلاسما، ادرار، بافت همژنه، لیزات سلولی و مایع محیط کشت قابل اندازه‌گیری بوده و به طور کلی آزمایش بر اساس مهار واکنش اتواکسیداسیون پیروگالول می‌باشد. پیروگالول ماده‌ای است که در شرایط عدی 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.

آماده سازی معرف ها

۱) **Reagent 1 (R1) 10x**: برای هر ۱۰ نمونه دو میلی‌لیتر از R1 را با ۱۸ میلی‌لیتر آب دوبار تقطیر مخلوط و pH را به ۸/۲ برسانید (توصیه نوند سلامت به استفاده از NaOH بدین منظور است).

۲) **Reagent 2 (R2)**: برای هر ۱۰ نمونه، ۵۰ میکرولیتر از R2a را با ۴۹۵۰ میکرولیتر از معرف R2b مخلوط و به صورت کامل ورتکس نمایید (pH باید در موقع استفاده ۷/۴ باشد).

۳) **بافر لیز کننده Buffer 10x**: این بافر صرفا برای آماده سازی نمونه‌های بافتی و یا سلولی کاربرد دارد. بافر لیزکننده را در ابتدا ۱۰ برابر رقیق نمایید (یک میلی‌لیتر را با ۹ میلی‌لیتر آب دوبارتقطیر مخلوط و ورتکس نمایید).

آماده سازی نمونه‌ها:

نمونه‌های بافتی: برای لیز نمونه‌های بافتی از بافر (Buffer) موجود در کیت استفاده نموده و به ازای یک گرم از بافت نمونه، ۵ میلی‌لیتر از بافر را اضافه کرده و هموژنایز کنید (بدین منظور می‌توانید از هموژنایزر نوند سلامت با کد محصول ۱۶۰۱۰ استفاده کنید). سپس نمونه مورد نظر را در ۱۲۰۰۰ دور به مدت ۵ دقیقه در دمای ۴ درجه سانتیگراد سانتریفیوژ کنید و از مایع رویی به عنوان نمونه استفاده نمایید.

نمونه‌های سلولی: محیط کشت حاوی حداقل 10^6 سلول را در ۸۰۰ دور به مدت دو دقیقه سانتریفیوژ کرده و مایع رویی را دور بریزید. سلول‌های ته‌نشین شده را با PBS خنک شسته و مرحله قبلی را دوباره تکرار کنید. بعد از این مرحله سلول‌ها را با ۰/۵ میلی‌لیتر از بافر لیز کننده (Buffer) به مدت ده دقیقه در مجاورت یخ قرار داده، سپس سلول‌ها را همراه بافر سانتریفیوژ (۱۲۰۰۰ دور به مدت ۵ دقیقه) و از مایع رویی به عنوان نمونه استفاده نمایید.

نکته: در نمونه‌های پلاسما/سرم می‌توانید نمونه را با آب دیونیزه رقیق نمایید که در این صورت باید ضریب رقت را در فرمول لحاظ گردد.

اندازه‌گیری سوپراکسید دیسموتاز سیتوزولی (Cu/Zn)

نمونه‌های سرم یا پلاسما را در ۱۰۰۰۰ دور به مدت ۱۵ دقیقه در دمای ۴ درجه سانتی‌گراد سانتریفیوژ کرده و مایع رویی که حاوی Cu/Zn-SOD می‌باشد را به عنوان نمونه استفاده کنید. عدد نهایی پس از سنجش مقدار آنزیم سوپراکسید دیسموتاز سیتوزولی در نمونه خواهد بود.

اندازه‌گیری سوپراکسید دیسموتاز میتوکندریایی (Mn-SOD)

نمونه‌های سرم یا پلاسما را در ۱۰۰۰۰ دور به مدت ۱۵ دقیقه در دمای ۴ درجه سانتی‌گراد سانتریفیوژ کرده و مایع رویی که حاوی Cu/Zn-SOD می‌باشد را به عنوان نمونه استفاده کنید. در این حالت به نمونه سیانید پتاسیم اضافه کنید تا غلظت نهایی آن ۲ میلی‌مولار شود. عدد نهایی پس از سنجش مقدار آنزیم سوپراکسید دیسموتاز میتوکندریایی در نمونه خواهد بود.

اندازه‌گیری سوپراکسید دیسموتاز در نمونه‌های اریتروسیت RBC-SOD

برای سنجش این آنزیم در اریتروسیت‌ها می‌بایست کیت Nasodox- RBC ™ با کد محصول NS-15034 تهیه و نسبت به سنجش دقیق اقدام کنید

روش انجام:

برای انجام کار به ترتیب جدول زیر اقدام نمایید:

معرف	لوله نمونه (میکرولیتر)	لوله کنترل (میکرولیتر)
نمونه	**۵۰۰**	–
معرف یک (R1)	**۲۰۰۰**	**۲۰۰۰**
آب دیونیزه (DW)	–	**۵۰۰**
معرف بعدی را باید در داخل اسپکتروفتومتر اضافه نموده و زمان‌ها را مد نظر داشته باشید		
معرف دو (R2)	**۵۰۰**	**۵۰۰**
خوانش در طول موج ۴۲۰ نانومتر		

اختلاف جذب نوری نمونه و کنترل را در زمان صفر تا ۳ دقیقه با فاصله یک دقیقه قرایت و میانگین اختلاف آنها را به عنوان ΔOD در فرمول محاسبه استفاده نمایید.

محاسبه :

$$SOD\ activity\ (U/ml\ or\ mg\ protein) = \frac{\Delta OD\ Test}{\Delta OD\ Control} \times ۲۰۰$$

برای راحتی کار می‌توانید از محاسبه‌گر آنلاین که در وب‌سایت نوند سلامت وجود دارد، استفاده نمایید.

توصیه ها:

- ✓ کیت در یخچال (دمای ۲-۸ درجه سانتیگراد) نگهداری شود ولی معرف‌ها قبل از شروع آزمایش باید به دمای محیط (ترجیحاً دمای ۲۵ 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 ۸ ساعت) تهیه و استفاده شوند.
- ✓ استفاده از سانتریفیوژ یخچالدار توصیه می‌شود.
- ✓ از نمونه‌های حاوی EDTA استفاده نشود.

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