کیت سنجش نیتریک اکساید

Natrix™ (Nitric Oxide Assay Kit)

مقدمه:

نیتریک اکسید (NO) واسطه مولکولی بسیاری از فرآیندهای فیزیولوژیکی مانند گشادی عروق، التهاب، ترومبوز، ایمنی و انتقال عصبی می‌باشد. اکسید نیتریک، توسط آنزیم نیتریک‌اکساید سنتاز (NOS) از L-آرژینین، اکسیژن، و NADPH ساخته شده و به وسیله‌ی مهار انقباض عضله صاف عروق، تجمع پلاکتی و چسبندگی لکوسیت‌ها به اندوتلیوم در هومئوستاز عروق شرکت دارد. افراد مبتلا به آترواسکلروز، دیابت و فشار خون بالا اغلب در مسیرهای NO اختلالاتی را نشان می‌دهند.

روش‌های مختلفی جهت اندازه‌گیری NO در سیستم‌های بیولوژیکی طراحی شده است که یکی از این روش‌ها شامل استفاده از واکنش دیونیزه کردن و تشخیص با اسپکتروفتومتری است که نیتریت تولید شده توسط اکسیداسیون NO تحت شرایط فیزیولوژیکی را می‌سنجد. واکنش Griess نیز می‌تواند برای آنالیز نیترات از طریق کاهش کاتالیزوری آن به نیتریت استفاده شود.

کیت Natrix™، بر اساس روش Griess بوده که این روش، روشی ساده، تکرارپذیر و استاندارد برای اندازه‌گیریNO در نمونه‌های بیولوژیکی مانند سرم، پلاسما، ادرار، بافت هموژنه و لیز سلولی را فراهم می‌کند. در این روش مقدار نیتریک اکساید به طور غیرمستقیم سنجیده می‌شود بدین صورت که اسیدسولفانیلیک به واسطه واکنش با نیتریت در محلول اسیدی یک رنگ آزو را تشکیل می‌دهد که می‌تواند در جذب نوری ۵۲۰ تا ۵۹۰ نانومتر اندازه‌گیری شود.

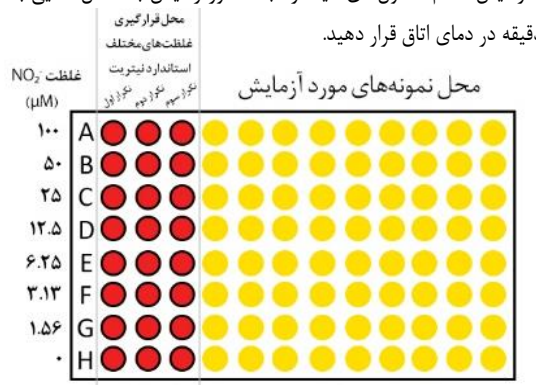
آماده سازی نمونه‌ها:

- نمونه‌های بافتی و کشت سلولی (حداقل سلول مورد نیاز ۲×۱۰^{۶}) را در PBS (pH=7.4) با نسبت ۱:۱هموژنیزه کرده و سپس با ۱۴۰۰۰ rpm سانتریفیوژ کنید. مایع رویی را جدا و پروتئین آن را به روشی که در ادامه به آن پرداخته می‌شود، رسوب دهید.
- توجه داشته باشید که برای افزایش دقت و حذف مداخله‌گرهای آزمایش باید پروتئین نمونه‌های سرم، پلاسما، خون کامل، بافت و سلول‌ها رسوب داده شود. بدین منظور ۱۵۰ میکرولیتر از نمونه را با ۸۰ میکرولیتر از بافر A (Buffer A) موجود در کیت در یک میکروتیوب ۱,۵ میلی‌لیتری مخلوط کرده و پس از ورتکس کامل، ۸۰ میکرولیتر از بافر B را اضافه و ورتکس نمائید. پس از مخلوط کامل، آن را به مدت ۱۰ دقیقه در سانتریفیوژ با دور ۱۴۰۰۰ قرار داده و سپس مایع رویی آن را جدا و به عنوان نمونه استفاده نمائید (در تمام مراحل استفاده از سانتریفیوژ یخچال دار توصیه می‌شود).
- توجه: نمونه‌های ادرار و بزاق نیازی به رسوب پروتئین ندارند.

روش کار:

۱. با توجه به تنوع نمونه‌های بیولوژیکی و افزایش دقت در اندازه‌گیری، پیشنهاد می‌شود ۳ نمونه از نمونه‌های خود را طبق روش کار (از بند ۲) انجام داده و میانگین آن‌ها را محاسبه نمائید. اگر نتایج در بازه ۱ تا ۱۰۰ میکرومول قرار گرفتند مابقی نمونه‌ها را نیز به همان روش انجام دهید، در غیر اینصورت به نسبت افزایش بیش از ۱۰۰ میکرومول در نمونه‌ها می‌توانید آنها را رقیق نموده و در آخر ضریب رقت را در نتایج اعمال نمایید. برای مثال اگر میانگین نمونه‌ها ۱۵۰ میکرومول باشد پیشنهاد می‌شود نمونه‌ها دوبرابر رقیق شوند.

۲. برای شروع آزمایش، تمام محلول‌های کیت را به منظور رسیدن به تعادل دمایی به مدت ۱۵ تا ۳۰ دقیقه در دمای اتاق قرار دهید.



۳. جهت تعیین مقدار دقیق سطوح NO_2 در نمونه‌های مورد آزمایش لازم است منحنی استاندارد نیتریت برای هر آزمون آماده شود. محلول استاندارد موجود در کیت را به نسبت ۱ به ۱۰ رقیق کنید. محلول رقیق شده غلظت ۱۰۰ میکرومولار استاندارد را خواهد داشت.

۴. ۳ ستون (۲۴ چاهک) از میکروپلیت ۹۶ چاهکی را برای منحنی مرجع استاندارد نیتریت تعیین کنید (دایره‌های قرمز در شکل). ۵۰ میکرولیتر آب دیونیزه را به چاهک‌های ردیف B-H اضافه کنید. ۱۰۰ میکرولیتر از محلول نیتریت ۱۰۰میکرومولار آماده شده را به ۳ چاهک باقی‌مانده در ردیف A اضافه کنید. در ادامه ۵۰ میکرولیتر از چاهک بالایی (ردیف A) را به چاهک پائینی اضافه نموده و این کار را به صورت سریالی تا ردیف G ادامه دهید تا غلظت‌های ۱۰۰، ۵۰، ۲۵، ۱۲/۵، ۶/۲۵، ۳/۱۳ و ۱/۵۶ میکرومولار را داشته باشید. در پایان این مرحله چاهک‌های ردیف H فقط حاوی آب دیونیزه خواهند بود.

۵. به میزان ۵۰ میکرولیتر از هر نمونه را در چاهک‌های زرد رنگ مطابق شکل بریزید.

۶. از معرف R1 آماده که در کیت قرار دارد به میزان ۵۰ میکرولیتر به هر چاهک (زرد و قرمز) اضافه و مخلوط نمائید سپس به مدت ۱۰ دقیقه دور از نور و در دمای اتاق انکوبه نمائید.

۷. بعد از انکوباسیون، معرف R2 را به میزان ۵۰ میکرولیتر به هر چاهک (زرد و قرمز) اضافه نموده و مخلوط نمائید. (نوند سلامت به منظور مخلوط کردن، انجام Pipetting را توصیه می‌کند)

۸. ۱۰ دقیقه پس از مخلوط‌کردن معرف‌ها، پلیت را در طول موج ۵۷۰ نانومتر در مقابل بلانک (۵۰μl R1 + ۵۰μl R2 +۵۰μl DW) قرائت نمائید. حداکثر مدت زمان پایدار بودن رنگ محلول‌ها ۳۰ دقیقه است.

توجه: حجم نهایی در هر چاهک ۵۰ میکرولیتر بوده و برای سنجش محدوده غلظت نیتریت ۰ تا ۱۰۰ میکرومولار است.

۹. با استفاده از نتایج به دست آمده منحنی استاندارد را رسم و از آن برای تعیین میزان غلظت نیتریک‌اکساید در نمونه مورد نظر استفاده نمائید و یا اینکه از فرمول خط حاصل از منحنی استاندارد نیز می‌توانید برای تعیین غلظت نیتریک‌اکساید موجود در نمونه ها استفاده نمائید.

***برای راحتی کار می‌توانید از محاسبه‌گر آنلاین که در صفحه اینترنتی نوند سلامت در آدرس Navandsalamat.com استفاده کنید**

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