کیت سنجش فعالیت آنزیم میلوپراکسیداز

Nampox™ (Myeloperoxidase Assay Kit)

مقدمه:

میلوپروکسیداز (MPO) آنزیمی از نوع پراکسیداز است که تشکیل اسیدهیپوکلرو را کاتالیز می‌کند و در گرانول‌های آزروفیل لکوسیت‌ها مخصوصا در نوتروفیل‌ها ذخیره می‌شود. این آنزیم در واکنش‌های التهابی آزاد شده و می‌تواند مارکری برای فعالیت نوتروفیل‌ها در آماس باشد. MPO خاصیت میکروب‌کشی قوی داشته و گاها به عنوان نشانگر برای لوسمی حاد نیز استفاده می شود. تحقیقات نشان می دهند که MPO را می توان به عنوان نشانگر التهاب شناخت. یافته های اخیر نشان می‌دهد که MPO در آسیب‌شناسی آتروژنز از طریق اکسیداسیون آپولیپوپروتئین A1 و تشکیل HDL معیوب و تغییر توانایی آن در اتصال و حذف کلسترول آزاد از بافت‌های محیطی نقش مهمی ایفا می‌کند.

اساسا فعالیت میلوپراکسیداز بر مبنای واکنش تشخیصی که شامل تترامتیل بنزدین (TMB) و پراکسید هیدروژن است اندازه‌گیری می‌شود. پس از تکامل رنگ، واکنش با اسید سولفوریک متوقف شده و جذب نوری TMB اکسید شده به روش طیف سنجی در طول موج ۴۵۰ نانومتر قابل سنجش می‌باشد.

کیت سنجش فعالیت میلوپراکسیداز (Nampox™) شرکت نوند سلامت، روشی ساده، تکرارپذیر و استاندارد برای اندازه‌گیری میزان فعالیت پراکسیدی میلوپراکسیداز است که در نمونه‌های بیولوژیکی مانند سرم، پلاسما، ادرار، بافت هموژنه و لیزات سلولی استفاده می‌شود.

روش کار:

۱) آماده‌سازی معرف‌ها:

- **Sample Buffer$_{2x}$**: به نسبت ۱:۱ با آب دیونیزه مخلوط و از رسیدن محلول به pH=6 اطمینان حاصل کنید (نوند سلامت استفاده از HCL را برای تنظیم pH توصیه می‌کند)، بافر آماده شده Sample Buffer$_{1x}$ حاوی ۰/۵ درصد هگزادسیل تری‌متیل آمونیوم بروماید می‌باشد.

توجه: اگر نمونه‌های مورد آزمایش سرم یا پلاسما هستند نیاز به آماده سازی Sample Buffer نیست و محلول ارسال شده آماده مصرف است.

- **R1**: این معرف را قبل از انجام آزمایش و به صورت تازه تهیه نمائید. بدین صورت که ۷ میکرولیتر از معرف R1 موجود در کیت را با ۱۰۰ میلی‌لیتر آب مقطر دیونیزه مخلوط و استفاده کنید. ماندگاری معرف آماده‌شده در دمای اتاق، ۱ ساعت است.
- **R2**: برای آماده سازی معرف ۲، تمام محلول موجود در R2b را به بطری R2a اضافه نموده و پس از مخلوط کردن و اطمینان از PH=5.4 به عنوان معرف ۲ آماده شده (R2) در روش کار از آن استفاده نمائید (نوند سلامت استفاده از HCL را برای تنظیم pH توصیه می‌کند). ماندگاری معرف آماده شده R2 در یخچال (دمای ۲-۸ درجه سانتیگراد) یک ماه می‌باشد.
- سایر معرف‌ها نیاز به آماده‌سازی نداشته و آماده مصرف هستند.

۲) آماده‌سازی نمونه:

- **برای لیز نمونه‌های بافتی**، در ابتدا حدود ۱۰ تا ۲۰ میلی‌گرم از نمونه را وزن کرده و پس از شستشوی کامل با PBS سرد، با یک میلی‌لیتر از Sample Buffer$_{1x}$ (سرد) آماده شده، هموژن نمائید. سپس در ۱۰۰۰۰ دور به مدت ۱۰ دقیقه سانتریفیوژ (نوند سلامت در این مرحله استفاده از سانتریفیوژ یخچالدار را توصیه می‌کند) کرده و برای انجام آزمایش از مایع‌رویی به عنوان نمونه استفاده نمائید. توجه داشته باشید که مایع رویی تا زمان استفاده باید روی یخ یا در یخچال نگهداری شود.
- **برای آماده‌سازی نمونه‌های سلولی**، ۲×۱۰^{۶} سلول در یک میلی‌لیتر Sample Buffer$_{1x}$ هموژن کرده و سپس در ۱۰۰۰۰ دور به مدت ۱۰ دقیقه سانتریفیوژ کنید. از محلول رویی به عنوان نمونه استفاده کنید. توجه داشته باشید که برای جداسازی سلول‌ها از کف پلیت، از مواد پروتئولیتیک (مانند تریپسین) استفاده نکنید.
- **برای آماده‌سازی نمونه‌های سرم و یا پلاسما**، قبل از شروع آزمایش نمونه مورد نظر را به نسبت ۱:۱ با Sample Buffer$_{2x}$ (بدون رقیق کردن) مخلوط کرده و از مخلوط حاصل به عنوان نمونه استفاده نمایید.

۳) روش اندازه‌گیری:

۱) ۱۰ میکرولیتر از نمونه سرم/بافت/ لیز سلولی آماده شده در مرحله قبلی را با ۸۰ میکرولیتراز R1 رقیق شده مخلوط کرده و سپس ۱۱۰ میکرولیتر از R2 آماده شده را به مخلوط اضافه نمائید. پلیت را با کاور پوشانده و به مدت ۵ تا ۱۰ دقیقه **دور از نور در دمای ۳۷ درجه** سانتیگراد انکوبه نمائید.

۲) در ادامه، ۵۰ میکرولیتر از R3 را برای خاتمه واکنش به تمام چاهک‌های پلیت ۹۶ خانه اضافه کنید.

۳) پلیت را با میکروپلیت ریدر در طول موج ۴۵۰ نانومتر در دقیقه اول و پنجم قرائت نمائید.

۴) محاسبه

$$\Delta Abs_{450nm} = \left[\frac{Abs\ 450\ nm\ Time\ 5\ min - Abs\ 450\ nm\ Time\ 1min}{4}\right]$$

و سپس با استفاده از فرمول زیر میزان فعالیت میلوپراکسیداز را محاسبه نمائید:

$$\textbf{MPO activity} = \frac{\Delta \textbf{Abs 450nm}}{3.9 \times 10^{4}(M^{-1}cm^{-1})} \times 40$$

واحد فعالیت آنزیم میلوپراکسیداز: *µmoles/min/ml or mg Pro*

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

توجه: در مورد نمونه‌های سرم و پلاسما که با $Sample\ Buffer_{2x}$ مخلوط شده‌اند عدد به دست آمده در فرمول را باید به ۲ ضرب نمائید و در سایر موارد اگر نمونه‌ها را رقیق نموده‌اید باید در فرمول ضریب رقت را اعمال نمائید.

توصیه‌ها:

- کیت در یخچال (دمای ۲-۸ درجه سانتی‌گراد) نگهداری شود اما معرف‌ها قبل از شروع آزمایش باید به دمای محیط (ترجیحا دمای ۲۰ درجه سانتی‌گراد) رسیده و قبل از استفاده ورتکس نمائید به گونه‌ایی که هیچ کریستالی در معرف‌ها دیده نشود.
- معرف۲ آماده شده حتما از لحاظ PH=۵/۴ کنترل شوند.
- نمونه‌ها پس از آماده سازی باید تا زمان انجام آزمایش در یخچال و یا روی یخ نگهداری شوند.
- از ایجاد کف و یا حباب در موقع مخلوط کردن مواد به جد پرهیز نمائید.
- اسید اسکوربیک و و اسید اوریک در نمونه‌ها، می‌توانند به عنوان مهار کننده میلوپراکسیداز عمل کرده و نتایج آزمون را تغییر دهند.
- توصیه می‌شود از هر نمونه ۳ بار تکرار انجام دهید و میانگین آن‌ها را به‌عنوان نتیجه نهایی در نظر بگیرید.
- رعایت زمان‌های ذکر شده در روش کار به خاطر اندازه‌گیری فعالیت آنزیم ضروری می‌باشد.
- در نمونه‌های بافتی و لیزات سلولی اندازه‌گیری پروتئین نیز توصیه می‌شود که می‌توانید بدین منظور از کیت Nadfrod™ نوند سلامت استفاده نمائید.
- در زمان کار با کیت رعایت اصول ایمنی آزمایشگاهی الزامی می‌باشد.