کیت سنجش سوپراکسید دیسموتاز در اریتروسیت
Erythro-Nasdox™

(Superoxide Dismutase Assay Kit for Erythrocyte Samples)

V_ 0.5

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، **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 $۲ \times ۱۰^{۹}\ m^{-1}\ s^{-1}$ 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.

محتوای کیت:

1. **Reagent 1**: 10 میلی لیتر
2. **Reagent 2a** : 2 میلی لیتر
3. **Reagent 2b**: 25 میلی لیتر
4. **Buffer** : 25 میلی لیتر
5. **Hb a** : 2.5 میلی لیتر
6. **Hb b** : 2.5 میلی لیتر
7. **Hb SD** : 7 میلی لیتر

آماده‌سازی معرف ها :

1) **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).

2) **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).

3) **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).

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 ۳۰۰۰ دور به مدت ۵ دقیقه سانتریفیوژ نموده و سپس مایع رویی(پلاسما) را جدا نمایید. سپس ۳ تا ۵ برابر حجم آن نرمال سالین اضافه کنید و در ۳۰۰۰ دور به مدت ۵ دقیقه سانتریفیوژ نمایید. عمل شستشو با نرمال سالین را حداقل ۳ 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 ۵۴۶ نانومتر قابل اندازه‌گیری است.

برای سنجش میزان هموگلوبین، به ازای هر ۲۰ نمونه، ۱ میلی‌لیتر از محلول Hb a را با ۱ میلی‌لیتر از محلول Hb b مخلوط و با آب مقطر به حجم ۵۰ میلی‌لیتر زسانده و به عنوان محلول درابکین در روش کار از آن استفاده نمایید (پایداری این محلول در دمای اتاق تا ۳ ماه است).

برای ترسیم منحنی استاندارد هموگلوبین، محلول استاندارد (Hb SD) را به دمای اتاق برسانید و سپس با استفاده از ۵ لوله، به ترتیب زیر غلظت‌های مختلف محلول استاندارد را تهیه نمایید:

شماره لوله	استاندارد	محلول درابکین	ارزش استاندارد (g/dl)
۱	صفر	۲/۵ میلی‌لیتر	(صفر- محلول بلانک)
۲	۱ میلی‌لیتر	۱/۵ میلی‌لیتر	۸
۳	۱/۵ میلی‌لیتر	۱ میلی‌لیتر	۱۲
۴	۲ میلی‌لیتر	۰/۵ میلی‌لیتر	۱۶
۵	۲/۵ میلی‌لیتر	صفر	۲۰

برای اندازه‌گیری هموگلوبین در نمونه‌ها، ۱۰ میکرولیتر از اریتروسیت‌های جدا شده را با ۲/۵ میلی‌لیتر از محلول درابکین (Hb a + Hb b+ DW) مخلوط کرده، ۵ دقیقه بعد از انکوباسیون در دمای اتاق، جذب آن را در طول موج ۵۴۶ نانومتر اندازه‌گیری نموده و با استفاده از منحنی استاندارد میزان هموگلوبین (g/dl) را محاسبه نمایید.

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

آماده‌سازی نمونه‌ها:

برای سنجش آنزیم سوپراکسید دیسموتاز در اریتروسیت‌ها، در ابتدا گلبولهای قرمز جدا شده را با استفاده از آب مقطر ۱ به ۱۰۰ رقیق نمایید (مثال: ۱۰ میکرولیتر از اریتروسیت ها را با ۹۹۰ 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)	۵۰۰	صفر
معرف یک (R1)	۲۰۰۰	۲۰۰۰
آب دیونیزه (DW)	صفر	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، دقیقه ۱، دقیقه ۲ و دقیقه ۳ قرائت و میانگین اختلاف آنها را به عنوان ΔOD در فرمول محاسبه استفاده نمایید.

محاسبه(۱)

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

محاسبه (۲)

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

توصیه‌ها:

- ✓ 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.
- ✓ محلول درابکین باید شفاف و رنگ زرد روشن باشد. در صورت مشاهده کدورت و یا بی رنگ شدن آن را دور بریزید.

عیب یابی :

مشکل	احتمالات موجود	راه حل های 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
	طول موج نادرست اسپکتوفوتومتر	تنظیمات دستگاه را چک نمایید
نمونه‌ها با قرائت (خوانش) نامنظم یا نامعقول	استفاده از مقادیر نادرست محلول ها / پایپت کردن نادرست	دقت در اضافه کردن مقدار صحیح مواد و پایپت درست
	استفاده ازنمونه های چند بار دفریز شده	اگر نمونه ها 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 ازنمونه های قدیمی یا نامناسب	از نمونه‌های تازه استفاده کرده و تا زمان استفاده به درستی نگهداری شود
عدم مشاهده فعالیت آنزیم در نمونه	فعالیت بسیار پایین آنزیم	افزایش رقت نمونه با دستگاه Evaporator
	رقت بسیار بالای نمونه	افزایش رقت نمونه با دستگاه Evaporator
نتایج غیر منتظره	نمونه ها در طول موج نادرست خوانده شوند	تنظیمات طول موج و دستگاه را بررسی نمایید

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