کیت سنجش فعالیت آنزیم میلوپراکسیداز

Nampox™ (Myeloperoxidase Assay Kit)

V_0.5

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 450 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.

محتویات کیت:

1. **Reagent 1**: 250 میکرولیتر (کیت 48 تستی)/ 500 میکرولیتر (کیت 96 تستی)
2. **Reagent 2a** : 2 ویال
3. **Reagent 2b**: 850 میکرولیتر (کیت 48 تستی)/ 1700 میکرولیتر (کیت 96 تستی)
4. **Reagent 2c**: 5 میلی لیتر (کیت 48 تستی)/ 10 میلی لیتر (کیت 96 تستی)
5. **Reagent 3** : 2.5 میلی لیتر (کیت 48 تستی)/ 5 میلی لیتر (کیت 96 تستی)
6. **Sample Buffer**: 25 میلی لیتر (کیت 48 تستی)/ 50 میلی لیتر (کیت 96 تستی)

موارد مورد نیازکه در داخل کیت موجود نیست:

- PBS (برای نمونه‌ای بافتی)
- هموژنایزر شیشه ای (هموژنایزر نوند سلامت با کد محصول 16010)
- سانتریفیوژ
- میکروپلیت ریدر با قابلیت خوانش 450 نانومتر

روش کار:

1) آماده‌سازی معرف‌ها:

- **$Sample\ Buffer_{2x}$**: به نسبت 1:1 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 0/5 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 7 میکرولیتر از معرف R1 موجود در کیت را با 100 میلی‌لیتر آب مقطر دیونیزه مخلوط و استفاده کنید. ماندگاری معرف آماده‌شده در دمای اتاق، 1 ساعت است.
- **R2**: برای آماده سازی معرف 2، در ابتدا 425 میکرولیتر از R2b (برای کیت 96 تستی 850 میکرولیتر) را به بطری R2a (حاوی پودر) اضافه نموده و پس از حل کردن پودر داخل بطری، به آن ۲۳۷۵ میکرولیتر (برای کیت 96 تستی 4750 میکرولیتر) از R2c اضافه کنید. مخلوط حاصل را ورتکس کرده و پس از اطمینان از PH=۵/۴، به عنوان معرف 2 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 (۲-۸ درجه سانتیگراد) 48 ساعت است.

- سایر معرف‌ها نیاز به آماده‌سازی نداشته و آماده مصرف هستند.

2) آماده‌سازی نمونه:

- **برای لیز نمونه‌های بافتی**، در ابتدا حدود ۱۰ تا 20 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**، 2×10^6 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: 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 1:1 با $Sample\ Buffer_{2x}$ (بدون رقیق کردن) مخلوط کرده و از مخلوط حاصل به عنوان نمونه استفاده 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

3) روش اندازه‌گیری:

1) 10 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 5 تا 10 دقیقه **دور از نور در دمای 37 درجه** سانتیگراد انکوبه نمائید.

2) در ادامه، 50 میکرولیتر از R3 را برای خاتمه واکنش به تمام چاهک‌های پلیت ۹۶ خانه اضافه کنید.

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

4) 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*

توجه: در مورد نمونه‌های سرم و پلاسما که با $Sample\ Buffer_{2x}$ مخلوط شده‌اند عدد به دست آمده در فرمول را باید به 2 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.

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
	پلیت ریدردرطول موج نادرست	تنظیمات فیلتر دستگاه را چک نمایید
نمونه‌ها با قرائت (خوانش) نامنظم یا نامعقول	نمونه ها در بافرهای متفاوتی تهیه شده باشند	از بافر موجود در کیت استفاده نموده و یا به دستورالعمل موجود در پروتکل مراجعه نمایید
	نمونه های کشت بافت/سلول به صورت کامل هموژن نشده باشند	هموژن کردن نمونه را تکرار نمایید. مدت زمان مرحله‌ی همگن سازی را افزایش دهید
	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

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

	استفاده ازنمونه های قدیمی یا نامناسب	از نمونه‌های تازه استفاده کرده و تا زمان استفاده به درستی نگهداری شود
خوانش بالا / پایین در نمونه ها و استانداردها	دمای نا مناسب ترکیبات	اجازه دهید تمام ترکیبات به دمای اتاق رسیده، سپس به آرامی ترکیب نمایید
	استفاده از کیت منقضی شده و یا نگهداری نامناسب معرف‌ها	تاریخ انقضای کیت را چک نموده و معرف ها را در شرایط مناسب نگهداری نمایید
	قرار گرفتن طولانی مدت معرف‌ها در معرض یخ	قبل از استفاده محلول واکنش تازه آماده کنید
	زمان و درجه حرارت نامناسب انکوباسیون	به پروتکل مراجعه کنید و زمان و دمای مناسب انکوباسیون را بررسی نمایید
	استفاده از حجم‌های نامناسب	از سمپلر کالیبره شده استفاده نموده و مواد را تقسیم نمایید
منحنی استاندارد غیر خطی	استفاده از ترکیبات نیمه گرم شده	قبل از آماده سازی محلول واکنش، همه اجزاء را به دمای مناسب رساتده سپس دوباره ترکیب نمایید
	خطاهای مرتبط با پیپت کردن در آماده سازی محلول‌های استاندارد	از حجم های بالا استفاده نمایید
	خطاهای پیپت کردن در محلول واکنش	محلول کار را هر زمان که ممکن است حاضر نمایید
	تشکیل حباب های هوا در چاهک‌ها	محتویات پیپت را به آرامی در چاهک ها خالی نمایید
	غلظت محلول استاندارد نادرست است	به دستورالعمل استاندارد رقت در پروتکل مراجعه کنید
	خطاهای محاسبات	بعد مراجعه به پروتکل ، محاسبات را دوباره انجام دهید
نتایج غیر منتظره	نمونه ها در طول موج نادرست خوانده شوند	تنظیمات فیلتر و دستگاه را بررسی نمایید
	نمونه ها دارای محتویات مداخله گر باشند	در صورت امکان نمونه را بیشتر رقیق نمایید
	خواندن نمونه در بالا / زیر محدوده خطی	نمونه های غلیظ یا رقیق کرده تا خوانایی در محدوده خطی باشند