



کیت سنجش نیتریک اکساید

Natrix™ (Nitric Oxide Assay Kit)
V_0.5

مقدمه:

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

روش های مختلفی جهت اندازه گیری NO در سیستم های بیولوژیکی طراحی شده است که یکی از این روش ها شامل استفاده از واکنش دیونیزه کردن و تشخیص با اسپکتروفتومتری است که نیتريت تولید شده توسط اکسیداسیون NO تحت شرایط فیزیولوژیکی را می سنجد. واکنش Griess نیز می تواند برای آنالیز نیترات از طریق کاهش کاتالیزوری آن به نیتريت استفاده شود.

کیت Natrix™ بر اساس روش Griess بوده که این روش، روشی ساده، تکرارپذیر و استاندارد برای اندازه گیری NO در نمونه های بیولوژیکی مانند سرم، پلاسما، ادرار، بافت هموزنه و لیز سلولی را فراهم می کند. در این روش مقدار نیتریک اکساید به طور غیرمستقیم سنجیده می شود بدین صورت که اسیدسولفانلیک به واسطه واکنش با نیتريت در محلول اسیدی یک رنگ آزو را تشکیل می دهد که می تواند در جذب نوری 520 تا 590 نانومتر اندازه گیری شود.

محتوای کیت:

1. Reagent 1: 3 میلی لیتر (کیت 48 تستی)/ 5 میلی لیتر (کیت 96 تستی) / 10 میلی لیتر (کیت 192 تستی)
2. Reagent 2: 3 میلی لیتر (کیت 48 تستی)/ 5 میلی لیتر (کیت 96 تستی) / 10 میلی لیتر (کیت 192 تستی)
3. Standard Solution: 2 میلی لیتر (کیت 48 تستی)/ 2 میلی لیتر (کیت 96 تستی) / 4 میلی لیتر (کیت 192 تستی)
4. Buffer A: 4 میلی لیتر (کیت 48 تستی)/ 8 میلی لیتر (کیت 96 تستی) / 20 میلی لیتر (کیت 192 تستی)
5. Buffer B: 4 میلی لیتر (کیت 48 تستی)/ 8 میلی لیتر (کیت 96 تستی) / 20 میلی لیتر (کیت 192 تستی)

موارد مورد نیاز که در داخل کیت موجود نیست:

- PBS (برای نمونه های بافتی)
- هموزنایز شیشه ای (هموزنایز نوند سلامت با کد محصول 16010)
- سانتریفیوژ
- میکروپلیت ریدر با قابلیت خوانش 570 نانومتر

آماده سازی نمونه ها:

نمونه های بافتی و کشت سلولی (حداقل سلول مورد نیاز 2×10^6) را در PBS (pH=7.4) با نسبت 1:1 هموزنیزه کرده و سپس با 14000 rpm سانتریفیوژ کنید. مایع رویی را جدا و پروتئین آن را به روشی که در ادامه به آن پرداخته می شود، رسوب دهید.

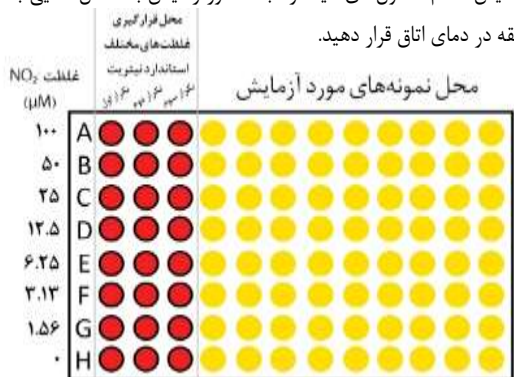
توجه داشته باشید که برای افزایش دقت و حذف مداخله گریهای آزمایش باید پروتئین نمونه های سرم، پلاسما، خون کامل، بافت و سلول ها رسوب داده شود. بدین منظور 150 میکرولیتر از نمونه را با 80 میکرولیتر از بافر A (Buffer A) موجود در کیت در یک میکروتیوب 1.5 میلی لیتری مخلوط کرده و پس از ورتکس کامل، 80 میکرولیتر از بافر B را اضافه و ورتکس نمائید. پس از مخلوط کامل، آن را به مدت 10 دقیقه در سانتریفیوژ با دور 14000 قرار داده و سپس مایع رویی آن را جدا و به عنوان نمونه استفاده نمائید (در تمام مراحل استفاده از سانتریفیوژ یخچال دار توصیه می شود).

توجه: نمونه های ادرار و بزاق نیازی به رسوب پروتئین ندارند.

روش کار:

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

۲. برای شروع آزمایش، تمام محلول های 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 NO₂ در نمونه های مورد آزمایش لازم است منحنی استاندارد نیتريت 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 96 چاهکی را برای منحنی مرجع استاندارد نیتريت تعیین کنید (دایره های قرمز در شکل). 50 میکرولیتر آب دیونیزه را به چاهک های ردیف B-H اضافه کنید. 100 میکرولیتر از محلول نیتريت 100 میکرومولار آماده شده را به 3



چاهک باقی‌مانده در ردیف A اضافه کنید. در ادامه 50 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 100، 50، 25، 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 50 میکرولیتر از هر نمونه را در چاهک‌های زرد رنگ مطابق شکل بریزید.

۶. از معرف R1 آماده که در کیت قرار دارد به میزان 50 میکرولیتر به هر چاهک (زرد و قرمز) اضافه و مخلوط نمائید سپس به مدت 10 دقیقه دور از نور و در دمای اتاق انکوبه نمائید.

۷. بعد از انکوباسیون، معرف R2 را به میزان 50 میکرولیتر به هر چاهک (زرد و قرمز) اضافه نموده و مخلوط نمائید. (نوند سلامت به منظور مخلوط کردن، انجام Pipetting را توصیه می‌کند)

۸. 10 دقیقه پس از مخلوط کردن معرف‌ها، پلیت را در طول موج 570 نانومتر در مقابل پلات (50μl R1 + 50μl R2 + 50μl DW) قرائت نمائید. حداکثر مدت زمان پایدار بودن رنگ محلول‌ها ۳۰ دقیقه است.

توجه: حجم نهایی در هر چاهک 150 میکرولیتر بوده و برای سنجش محدوده غلظت نیتریت 0 تا 100 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 نمونه‌ها استفاده نمائید.

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

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 دقیقاً پیروی نمائید
	پلیت ریدر در طول موج نادرست	تنظیمات فیلتر دستگاه را چک نمائید
نمونه‌ها با قرائت (خوانش) نامنظم یا نامعقول	نمونه‌ها در بافرهای متفاوتی تهیه شده باشند	از بافر موجود در کیت استفاده نموده و یا به دستورالعمل موجود در پروتکل مراجعه نمائید
	نمونه‌های کشت بافت/سلول به صورت کامل هموژن نشده باشند	هموژن کردن نمونه را تکرار نمائید. مدت زمان مرحله‌ی همگن سازی را افزایش دهید
	استفاده از نمونه‌های چند بار دفریز شده	اگر نمونه‌ها چندین بار مورد استفاده قرار خواهند گرفت آن‌های را به دو یا سه قسمت تقسیم نمائید
	استفاده از نمونه‌های قدیمی یا نامناسب	از نمونه‌های تازه استفاده کرده و تا زمان استفاده به درستی نگهداری شود
خوانش بالا / پایین در نمونه‌ها و استانداردها	دمای نامناسب ترکیبات	اجازه دهید تمام ترکیبات به دمای اتاق رسیده، سپس به آرامی ترکیب نمائید
	استفاده از کیت منقضی شده و یا نگهداری نامناسب معرف‌ها	تاریخ انقضای کیت را چک نموده و معرف‌ها را در شرایط مناسب نگهداری نمائید
	استفاده از حجم‌های نامناسب	از سمپلر کالیبره شده استفاده نموده و مواد را تقسیم نمائید
منحنی استاندارد غیر خطی	استفاده از ترکیبات نیمه گرم شده	قبل از آماده سازی محلول واکنش، همه اجزاء را به دمای مناسب رسانده سپس دوباره ترکیب نمائید
	خطاهای مرتبط با پیپت کردن در آماده سازی محلول‌های استاندارد	از حجم‌های بالا استفاده نمائید



خطاهای پیپت کردن در محلول واکنش	محلول کار را هر زمان که ممکن است حاضر نمایید	
تشکیل حباب های هوا در چاهک ها	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	
نمونه ها در طول موج نادرست خوانده شوند	تنظیمات فیلتر و دستگاه را بررسی نمایید	نتایج غیر منتظره
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	