



کیت سنجش سوپراکسید دیسموتاز در اریتروسیت

Erythro-Nasdox™ Superoxide Dismutase (SOD) Assay Kit for Erythrocyte Samples

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 متالوپروتئین هستند. این دسته از آنزیم‌ها واکنش دیسموتاسیون آنیون سوپراکسید (O_2^-) به اکسیژن و پراکسید هیدروژن را کاتالیز می‌کنند. دیسموتاسیون نوع خاصی از واکنش‌های ردوکس است که در آن، 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 $2 \times 10^9 \text{ m}^{-1} \text{ s}^{-1}$ 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 در نمونه‌های بیولوژیکی مانند سرم، پلاسما، ادرار، بافت هموزنه، لیزات سلولی و مایع محیط کشت 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:

- 10X Buffer: ۲۵ میلی‌لیتر (کیت ۵۰ تستی) / ۵۰ میلی‌لیتر (کیت ۱۰۰ تستی)
- 10X Reagent 1: ۱۰ میلی‌لیتر (کیت ۵۰ تستی) / ۲۰ میلی‌لیتر (کیت ۱۰۰ تستی)
- 2a Reagent: ۱ میلی‌لیتر (کیت ۵۰ تستی) / ۱ میلی‌لیتر (کیت ۱۰۰ تستی)
- 2b Reagent: ۲۵ میلی‌لیتر (کیت ۵۰ تستی) / ۵۰ میلی‌لیتر (کیت ۱۰۰ تستی)
- Hb a: ۲/۵ میلی‌لیتر (کیت ۵۰ تستی) / ۵ میلی‌لیتر (کیت ۱۰۰ تستی)
- Hb b: ۲/۵ میلی‌لیتر (کیت ۵۰ تستی) / ۵ میلی‌لیتر (کیت ۱۰۰ تستی)
- Hb SD: ۷ میلی‌لیتر (کیت ۵۰ تستی) / ۷ میلی‌لیتر (کیت ۱۰۰ تستی)

موارد مورد نیاز که در داخل کیت موجود نیست:

- اسپکتروفتومتر با قابلیت اندازه‌گیری جذب (OD) ۴۰۵ نانومتر
- سانتریفیوژ
- آب دیونیزه



مراحل انجام آزمایش:

۱) 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 رسانده 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.

۲) آماده سازی محلول کار:

- **Reagent 1 (R1)_{10x}**: برای هر ۱۰ نمونه ۲ 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).
- **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).
- **بافر لیز کننده Buffer_{10x}**: این بافر صرفاً برای آماده‌سازی نمونه‌های بافتی و یا سلولی کاربرد دارد. بافر لیزکننده را در ابتدا ۱۰ برابر رقیق نمایید (یک میلی‌لیتر را با ۹ میلی‌لیتر آب دوبار تقطیر مخلوط و ورتکس نمایید).

۳) روش کار:

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 اریتروسیت‌ها را با ۹۹۰ میکرولیتر آب مقطر رقیق کنید) و در جدول زیر به عنوان نمونه استفاده نمایید.

معرف‌ها	لوله نمونه (میکرولیتر)	لوله کنترل (میکرولیتر)
نمونه	۵۰۰	-
معرف یک (R1)	۲۰۰۰	۲۰۰۰
آب دیونیزه (DW)	-	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		

- توجه داشته باشید که فاکتور رقت را در فرمول و محاسبات لحاظ کنید. برای انجام کار به ترتیب جدول اقدام نمایید. 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.



۴) محاسبات:

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

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

۵) توصیه‌ها:

- محتویات کیت در یخچال (دمای ۲-۸ درجه سانتی‌گراد) نگهداری شود و نیم ساعت قبل از شروع آزمایش معرفها را به دمای محیط (ترجیحاً دمای ۲۵ درجه سانتی‌گراد) برسانید.
- تمامی مواد را قبل از استفاده ورتکس نمایید به گونه‌ایی که هیچ کریستالی در معرفها دیده نشود.
- محلول درابکین باید شفاف و رنگ زرد روشن باشد. در صورت مشاهده کدورت و یا بی رنگ شدن آن را دور بریزید.
- ممکن است یک پژوهشگر نتایج متفاوت از آزمایش مشابه به دست بیاورد. به منظور بهتر شدن نتایج، توصیه می‌شود از هر نمونه دوبار تکرار انجام گرفته و میانگین آن‌ها را به عنوان نتیجه نهایی گزارش کنید.
- تمام محلول‌ها باید به صورت تازه (کمتر از ۸ ساعت) تهیه و استفاده شوند.
- استفاده از سانتریفیوژ یخچالدار توصیه می‌شود.
- از نمونه‌های حاوی EDTA استفاده نشود.
- در نمونه‌های بافتی و لیزات سلولی اندازه‌گیری پروتئین نیز توصیه می‌شود که می‌توانید بدین منظور از کیت **Nadford™** نوند سلامت استفاده نمایید.
- قبل از شروع آزمایش، از کافی بودن مقدار نمونه‌ها و محلول‌ها اطمینان حاصل کنید.
- کیت‌های مختلف ممکن است حساسیت، محدوده تشخیص و روش کار متفاوتی داشته باشند، لذا آزمایش را دقیقاً طبق روش کار مندرج در این پروتکل انجام دهید.
- محلول و مواد دیگر را جایگزین محلول و مواد داخل کیت نکرده و تنها از مواد موجود در کیت استفاده کنید.
- پس از شروع آزمایش، تمام مراحل باید بدون وقفه، کامل شود. اطمینان حاصل کنید که همه معرفها، مواد و دستگاه‌ها در زمان مناسب آماده می‌شوند.
- زمان انکوباسیون نتایج را تحت تأثیر قرار خواهد داد لذا همه چاهک‌ها باید در همان ترتیب و زمان، مورد استفاده قرار گیرند.
- در زمان کار با کیت رعایت اصول ایمنی آزمایشگاهی الزامی می‌باشد.

۶) عیب‌یابی:

مشکل	احتمالات موجود	راه حل‌های پیشنهادی
عدم کارکرد سنجش یا آزمایش	سرد بودن بافر آزمایش	دمای بافر باید به دمای اتاق رسیده باشد
	عدم رعایت ترتیب مراحل آزمایش	به پروتکل موجود مراجعه کرده و دقیقاً پیروی نمایید
	پلیت ریدر در طول موج نادرست	تنظیمات فیلتر دستگاه را چک نمایید
نمونه‌ها با قرائت (خوانش) نامنظم یا نامعقول	استفاده از مقادیر نادرست محلول‌ها / پایت کردن نادرست	دقت در اضافه کردن مقدار صحیح مواد و پایت درست
	استفاده از نمونه‌های چند بار دفریز شده	اگر نمونه‌ها چندین بار مورد استفاده قرار خواهند گرفت نمونه‌ها را در هنگام نمونه‌برداری به دو یا سه قسمت تقسیم نموده و فریز نمایید
	وجود ماده‌ی مداخله‌گر در نمونه	در صورت امکان نمونه را بیشتر رقیق نمایید
عدم مشاهده فعالیت آنزیم در نمونه	استفاده از نمونه‌های قدیمی یا نامناسب	ترجیحاً از نمونه‌های تازه استفاده کنید
	فعالیت بسیار پایین آنزیم	افزایش رقت نمونه یا دستگاه Evaporator
نتایج غیر منتظره	رقت بسیار بالای نمونه	افزایش رقت نمونه یا دستگاه Evaporator
	نمونه‌ها در طول موج نادرست خوانده شوند	تنظیمات فیلتر و دستگاه را بررسی نمایید

- در صورتی که در انجام هر یک از مراحل آزمایش دچار ابهام، مشکل یا اشتباه شده‌اید، نگران نباشید، تیم پشتیبانی فنی نوند سلامت در کنار شماست. کافی است به شماره تلفن ۰۹۰۱۴۱۴۰۹۷ از طریق واتساپ/تلگرام پیام دهید. کارشناسان ما برای رفع مشکل با شما تماس خواهند گرفت.
- نظرات و پیشنهادات مشتریان، همواره پله‌های پیشرفت و بهبود کیفیت را در نوند سلامت تشکیل می‌دهند. لذا در صورت وجود هرگونه نظر، انتقاد یا پیشنهاد، لطفاً آن را از طریق ایمیل hi@navandsalamat.com با ما در میان بگذارید.