کیت سنجش فعالیت آنزیم میلوپراکسیداز

Nampox™ Myeloperoxidase (MPO) Activity 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 می‌شود. تحقیقات نشان می‌دهند که MPO را می‌توان به عنوان نشانگر التهاب شناخت. یافته‌های 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 تترامتیل بنزدین (TMB) و پراکسیدهیدروژن بوده و در طول موج ۶۵۰ نانومتر قابل سنجش می‌باشد.

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

محتوای کیت:

ردیف	دمای نگهداری	نام ماده	۴۸ تست	۹۶ تست
۱	۲-۸ °C	**Reagent 1**	۲۵۰ میکرولیتر	۵۰۰ میکرولیتر
۲	۲-۸ °C	**Reagent 2a**	۲ ویال	۲ ویال
۳	۲-۸ °C	**Reagent 2b**	۸۵۰ میکرولیتر	۱۷۰۰ میکرولیتر
۴	۲-۸ °C	**Reagent 2c**	۵ میلی‌لیتر	۱۰ میلی‌لیتر
۵	۲-۸ °C	**Sample Buffer 2X**	۲۵ میلی‌لیتر	۵۰ میلی‌لیتر
۶	-	**96-Well plate**	۱ عدد	۱ عدد

موارد مورد نیاز که در داخل کیت موجود نیست:

- میکروپلیت‌ریدر با قابلیت اندازه‌گیری جذب (OD) ۶۳۰ تا ۶۵۰ نانومتر
- هموژنایزر شیشه‌ای (در صورت استفاده از بافت به عنوان نمونه)
- فسفات بافر (در صورت استفاده از بافت به عنوان نمونه)
- سانتریفوژ

مراحل انجام آزمایش:

۱) آماده‌سازی محلول کار:

- **Sample Buffer 2X:** برای آماده‌سازی بافر برای استفاده در نمونه‌های بافتی و یا سلولی، بافر موجود در کیت را 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).
- **Reagent 1:** 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.
- **Reagent 2 (برای کیت ۴۸ تست):** برای آماده‌سازی معرف ۲، ابتدا **۴۲۵ میکرولیتر** از **R2b** را به بطری **R2a** (حاوی پودر) اضافه نموده و پس از حل کردن پودر داخل بطری، به آن **۲۳۷۵ میکرولیتر** از **R2c** اضافه کنید. مخلوط حاصل را ورتکس کرده و pH محلول حاصل را بین ۴/۵ تا ۵/۵ تنظیم نمایید (نوند سلامت استفاده از HCL را برای تنظیم pH توصیه می‌کند). محلول حاصل به عنوان محلول **R2** آماده

Copyright © 2020 Navand Salamat. All rights reserved

قابل استفاده است. توجه نمایید که ماندگاری معرف آماده شده **R2** در یخچال (۲-۸ درجه سانتی‌گراد) ۴۸ ساعت است.

- **توجه:** محتویات بطری **R2a** ممکن است به درب آن چسبیده و از مقدار مورد نیاز کاسته شود. لذا حتما پس از افزودن **R2b** بطری را بصورت سر و ته و حرکات متوالی تکان دهید تا تمامی پودر موجود در آن حل شود.
- **Reagent 2 (برای کیت ۹۶ تست):** برای آماده‌سازی معرف ۲، ابتدا **۸۵۰ میکرولیتر** از **R2b** را به بطری **R2a** (حاوی پودر) اضافه نموده و پس از حل کردن پودر داخل بطری، به آن **۴۷۵۰ میکرولیتر** از **R2c** اضافه کنید. مخلوط حاصل را ورتکس کرده و pH محلول حاصل را بین ۴/۵ تا ۵/۵ تنظیم نمایید (نوند سلامت استفاده از HCL را برای تنظیم pH توصیه می‌کند). محلول حاصل به عنوان محلول **R2** آماده قابل استفاده است. توجه نمایید که ماندگاری معرف آماده شده **R2** در یخچال (۲-۸ درجه سانتی‌گراد) ۴۸ ساعت است.
- **توجه:** محتویات بطری **R2a** ممکن است به درب آن چسبیده و از مقدار مورد نیاز کاسته شود. لذا حتما پس از افزودن **R2b** بطری را بصورت سر و ته و حرکات متوالی تکان دهید تا تمامی پودر موجود در آن حل شود.
- سایر معرف‌ها نیاز به آماده‌سازی نداشته و آماده مصرف هستند.

۲) آماده‌سازی نمونه‌ها:

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.

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.

نمونه‌های ادرار، سرم و یا پلاسما: نمونه‌های ادرار، سرم و یا پلاسما بدون رقت سازی می توانند استفاده شوند ولی در صورت داشتن جذب نوری بالای ۲ بهتر است نمونه‌ها را قبل از شروع آزمایش ده برابر با **Sample Buffer 1X** (رقیق شده) مخلوط کرده و در ۱۰۰۰۰ دور به مدت ۱۰ دقیقه سانتیرفیوژ نمایید. از مایع رویی پس از سانتریفیوژ به عنوان نمونه استفاده نمایید (مثال: ۱۰۰ میکرولیتر نمونه با ۹۰۰ میکرولیتر از Sample Buffer 1X مخلوط نمایید).
توجه: در صورت رقت‌سازی بایستی ضریب رقت در فرمول محاسبات اعمال گردد.

۳) روش کار:

A. برای شروع آزمایش ۱۰ میکرولیتر از نمونه (ادرار، سرم، بافت، لیز سلولی) را با ۸۰ میکرولیتر از **R1** رقیق شده مخلوط کرده و به مدت ۱۰ دقیقه در دمای اتاق و به دور از نور انکوبه کنید. در ادامه ۱۱۰ میکرولیتر از **R2** آماده شده را به مخلوط اضافه و شیک کنید.

B. پلیت را با میکروپلیت ریدر در طول موج ۶۵۰ نانومتر (۶۳۰ تا ۶۵۰ نانومتر) در دقیقه اول (ثانیه ۶۰) و دهم (ثانیه ۶۰۰) قرائت و یادداشت نمائید.

۴) محاسبات:

با استفاده از فرمول زیر، **ΔAbs 650nm** را محاسبه و در فرمول بعدی وارد نمایید:

$$\Delta\text{Abs 650nm}=\left[\frac{\text{Abs 650 nm Time 10 min} - \text{Abs 650 nm Time 1min}}{9}\right]$$

$$\text{MPO activity}\left({}^{U}/_{L\ (g\ Tissue)}\right)=\frac{\Delta\text{Abs 650nm}\ \times 10^{7}}{\varepsilon\ \times 0.4\ cm}\times\frac{0.2}{0.01}\times K$$

ε و یا ضریب خاموشی برای TMB در ۶۵۰ نانومتر معادل **۳/۹ × ۱۰^۴ M^-1 cm^-1** بوده و در فرمول بالا قرار می‌گیرد.

K ضریب رقت نمونه

Copyright © 2020 Navand Salamat. All rights reserved

۵) توصیه‌ها:

- محتویات 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.
- برای اندازه گیری MPO در نمونه های بافتی، سرم و پلاسما می توان آنها را در منفی ۸۰ درجه سانتیگراد به مدت یک ماه نگهداری کرد.
- نمونه‌ها پس از آماده‌سازی باید تا زمان انجام آزمایش در یخچال و یا روی یخ نگهداری شوند.
- از ایجاد کف و یا حباب در موقع مخلوط کردن مواد به‌صورت جدی پرهیز نمائید.
- اسید اسکوربیک و و اسید اوریک در نمونه‌ها، می‌توانند به عنوان مهار کننده میلوپراکسیداز عمل کرده و نتایج آزمون را تغییر دهند.
- ممکن است یک پژوهشگر نتایج متفاوت از آزمایش مشابه به دست بیاورد. 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™ (NS-15073 و NS-15074)** نوند سلامت استفاده نمائید.
- قبل از شروع آزمایش، از کافی بودن مقدار نمونه‌ها اطمینان حاصل کنید.
- کیت‌های مختلف ممکن است حساسیت، محدوده تشخیص و روش کار متفاوتی داشته باشند، لذا آزمایش را دقیقا طبق روش کار مندرج در این پروتکل انجام دهید.
- محلول و مواد دیگر را جایگزین محلول و مواد و داخل کیت نکرده و تنها از مواد موجود در کیت استفاده کنید.
- 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 دقیقا پیروی نمایید
	پلیت ریدر در طول موج نادرست	تنظیمات فیلتر دستگاه را چک نمایید
نمونه‌ها با قرائت (خوانش) نامنظم یا نامعقول	آماده‌سازی نمونه‌ها با بافر نادرست	از بافر موجود در کیت استفاده نموده و یا به دستورالعمل موجود در پروتکل مراجعه نمایید
	نمونه‌های کشت بافت/سلول به صورت کامل هموژن نشده	هموژن کردن نمونه را تکرار نموده و مدت زمان مرحله‌ی همگن‌سازی را افزایش دهید
	استفاده از نمونه‌های چند بار دفریز شده	اگر نمونه ها 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
	استفاده از نمونه‌های قدیمی یا نامناسب	ترجیحا از نمونه‌های تازه استفاده کنید
خوانش بالا و یا پایین در نمونه‌ها و استانداردها	دمای نامناسب ترکیبات	اجازه دهید تمام ترکیبات به دمای اتاق رسید، سپس به آرامی ترکیب نمایید
	استفاده از کیت منقضی شده و یا نگهداری نامناسب معرف‌ها	تاریخ انقضای کیت را چک نموده و معرف‌ها را در شرایط مناسب نگهداری نمایید
	قرار گرفتن طولانی مدت معرف‌ها در معرض یخ	محلول کار را قبل از استفاده آماده کنید
	زمان و درجه حرارت نامناسب انکوباسیون	به پروتکل مراجعه کرده و زمان و دمای مناسب انکوباسیون را بررسی نمایید
	استفاده از حجم‌های نامناسب	از سمپلر کالیبره شده استفاده نمایید
نتایج غیر منتظره	نمونه‌ها در طول موج نادرست خوانده شوند	تنظیمات فیلتر و دستگاه را بررسی نمایید
	نمونه‌ها دارای محتویات مداخله‌گر باشند	در صورت امکان نمونه را بیشتر رقیق نمایید
	خواندن نمونه در بالا و یا زیر محدوده خطی	نمونه‌های غلیظ یا رقیق کرده تا خوانایی آن‌ها در محدوده خطی قرار گیرد

- 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 ۰۹۰۱۴۱۱۴۰۹۷ 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، لطفا آن را از طریق ایمیل hi@navandsalamat.com با ما در میان بگذارید.

Copyright © 2020 Navand Salamat. All rights reserved