کیت سنجش فعالیت سوپراکسید دیسموتاز

Nasdox™ Superoxide Dismutase (SOD) Activity Assay Kit

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، اریتروسیت ها 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 $2 \times 109\ m^{-1}\ s^{-1}$ 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 فعالیت آنزیم سوپراکسید دیسموتاز Nasdox™ روشی ساده، تکرارپذیر و استاندارد بوده و در نمونه‌های بیولوژیکی مانند سرم، پلاسما، بافت هموژنه و لیزات سلولی 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.

محتوای کیت:

ردیف	دمای نگهداری	نام ماده	۴۸ تست	۹۶ تست
۱	2-8 °C	**Reagent 1 10X**	۱ میلی‌لیتر	۲ میلی‌لیتر
۲	2-8 °C	**Reagent 2a**	۱۰۰ میکرولیتر	۲۰۰ میکرولیتر
۳	2-8 °C	**Reagent 2b**	۲/۵ میلی‌لیتر	۵ میلی‌لیتر
۴	2-8 °C	**Lysing Buffer 10X**	۱۰ میلی‌لیتر	۲۰ میلی‌لیتر
۵	RT	**96-Well plate**	۱ عدد	۱ عدد

موارد مورد نیاز که در داخل کیت موجود نیست:

- میکروپلیت‌ریدر با قابلیت اندازه‌گیری جذب (OD) ۴۰۵ نانومتر
- هموژنایزر (در صورت استفاده از بافت به عنوان نمونه)
- فسفات بافر (در صورت استفاده از سلول به عنوان نمونه)
- سانتریفوژ
- آب دوبار تقطیر

Copyright © 2022 Navand Salamat. All rights reserved

مراحل انجام آزمایش:

۱) آماده سازی محلول کار:

- **بافر لیز کننده $Lysing\ Buffer_{10X}$:** این بافر صرفا 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).
- **$Reagent\ 1\ (R1)_{10X}$:** برای هر ۱۰ نمونه ۲۰۰ میکرولیتر از **R1** را با ۱/۸ 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، پنج میکرولیتر از **R2a** را با ۴۹۵ میکرولیتر از معرف **R2b** مخلوط و به صورت کامل ورتکس نمایید (pH باید در موقع استفاده ۷/۴ باشد).

۲) آماده‌سازی نمونه‌ها:

نمونه‌های بافتی: برای لیز نمونه‌های بافتی از بافر (Lysing Buffer) رقیق شده، استفاده نموده و به ازای ۱۰۰ میلی‌گرم از بافت نمونه، ۵۰۰ میکرولیتر از بافر را اضافه و هموژن کنید (بدین منظور می‌توانید از هموژنایزر نوند سلامت با کد محصول ۱۶۰۱۰ استفاده کنید). سپس نمونه مورد نظر را در ۱۲۰۰۰ دور به مدت ۵ دقیقه در دمای ۴ درجه سانتیگراد سانتریفیوژ کنید و از مایع رویی به عنوان نمونه استفاده نمایید.

نمونه‌های سلولی: محیط کشت حاوی حداقل 10^6 سلول را در ۸۰۰ دور به مدت دو دقیقه سانتریفیوژ کرده و مایع رویی را دور بریزید. سلول‌های ته‌نشین شده را با PBS خنک شسته و مرحله قبلی را دوباره تکرار کنید. بعد از این مرحله سلول‌ها را با ۰/۵ میلی‌لیتر از بافر لیز کننده (**Lysing Buffer**) آماده شده، به مدت ده دقیقه در مجاورت یخ ورتکس کرده، سپس سلول‌ها را همراه بافر سانتریفیوژ (۱۲۰۰۰ دور به مدت ۵ دقیقه) و از مایع رویی به عنوان نمونه استفاده نمایید.

نکته: در نمونه‌های پلاسما/سرم می‌توانید نمونه را با آب دیونیزه رقیق نمایید که در این صورت باید ضریب رقت را در فرمول لحاظ گردد.

اندازه‌گیری سوپراکسید دیسموتاز سیتوزولی (Cu/Zn): نمونه‌های سرم یا پلاسما را در ۱۰۰۰۰ دور به مدت ۱۵ دقیقه در دمای ۴ درجه سانتی‌گراد سانتریفیوژ کرده و مایع رویی که حاوی Cu/Zn-SOD می‌باشد را به عنوان نمونه استفاده کنید. عدد نهایی پس از سنجش مقدار آنزیم سوپراکسید دیسموتاز سیتوزولی در نمونه خواهد بود.

اندازه‌گیری سوپراکسید دیسموتاز میتوکندریایی (Mn-SOD): نمونه‌های سرم یا پلاسما را در ۱۰۰۰۰ دور به مدت ۱۵ دقیقه در دمای ۴ درجه سانتی‌گراد سانتریفیوژ کرده و مایع رویی که حاوی Cu/Zn-SOD می‌باشد را به عنوان نمونه استفاده کنید. در این حالت به نمونه سیانید پتاسیم اضافه کنید تا غلظت نهایی آن در ظرف حاوی نمونه ۲ میلی‌مولار شود. عدد نهایی پس از سنجش مقدار آنزیم سوپراکسید دیسموتاز میتوکندریایی در نمونه خواهد بود.

اندازه‌گیری سوپراکسید دیسموتاز در نمونه‌های اریتروسیت RBC-SOD: برای سنجش این آنزیم در اریتروسیت‌ها می‌بایست کیت **Erythro-Nasodox™** با کد محصول NS-15036 شرکت نوند سلامت را تهیه و نسبت به سنجش دقیق اقدام کنید.

۳) روش کار:

برای انجام کار به ترتیب جدول روبرو مواد را به چاهک‌های پلیت ۹۶ خانه اضافه کنید. پس از ۵ دقیقه انکوباسیون در دمای اتاق و به دور از نور، جذب نوری نمونه‌ها را در طول موج ۴۰۵ نانومتر توسط دستگاه میکروپلیت ریدر قرائت و به عنوان OD نمونه در فرمول محاسبه استفاده نمایید.

معرف‌ها	چاهک‌های نمونه (میکرولیتر)	چاهک کنترل (میکرولیتر)
نمونه	۵۰	-
معرف یک (R1)	۲۰۰	۲۰۰
آب دیونیزه (DW)	-	۵۰
معرف دو (R2)	۵۰	۵۰

Copyright © 2022 Navand Salamat. All rights reserved

۴) محاسبه:

$$\text{SOD activity (U/ml or mg protein)} = \frac{\text{OD Test}}{\text{OD Control}} \times 200$$

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.
- 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 نمائید.
- 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 دقیقا 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 دقیقا 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 / پایپت کردن نادرست	دقت در اضافه کردن مقدار صحیح مواد و پایپت درست
	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
عدم مشاهده فعالیت آنزیم در نمونه	فعالیت بسیار پایین آنزیم	افزایش رقت نمونه با دستگاه Evaporator
	رقت بسیار بالای نمونه	کاهش رقت نمونه
نتایج غیر منتظره	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 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 © 2022 Navand Salamat. All rights reserved