کیت سنجش وضعیت تام اکسیدانی

Natos™ Total Oxidant Status (TOS) Assay Kit

مقدمه:

گونه‌های فعال اکسیژن و نیتروژن در فرآیندهای متابولیکی و فیزیولوژیکی تولید می‌شوند و واکنش‌های مضر اکسیداتیو ممکن است ارگانیسم‌های درگیر در مکانیسم‌های آنتی‌اکسیدانی آنزیمی و غیر آنزیمی رخ دهد. در شرایط خاص، افزایش اکسیدان‌ها و کاهش آنتی‌اکسیدان‌ها نمی‌تواند مانع آسیب شده و اختلالات گسترده‌ای در بدن رخ می‌دهد. غلظت سرمی (یا پلاسما) گونه‌های مختلف اکسیدان می‌تواند به صورت جداگانه اندازه‌گیری شود، اما این اندازه‌گیری‌ها زمان‌بر، نیازمند کار زیاد و پر هزینه هستند و نیاز به تکنیک‌های پیچیده دارند. از آنجا که اندازه‌گیری مولکول‌های مختلف اکسیدان به طور جداگانه عملی نیست و اثرات اکسیدان آن‌ها افزایشی است، وضعیت کل اکسیدان (TOS) نمونه اندازه‌گیری شده و این مقدار به عنوان کل پراکسید و فعالیت اکسیداسیونی نمونه نامیده می‌شود.

محتوای کیت:

ردیف	دمای نگهداری	نام ماده	۴۸ تست	۹۶ تست
۱	2-8 °C	**Reagent 1**	۱۲ میلی‌لیتر	۲۴ میلی‌لیتر
۲	2-8 °C	**Reagent 2**	۱ میلی‌لیتر	۲ میلی‌لیتر
۳	2-8 °C	**Lysing Buffer**	۵۰ میلی‌لیتر	۱۰۰ میلی‌لیتر
۴	2-8 °C	**Standard Solution**	۱۰۰ میکرولیتر	۱۰۰ میکرولیتر
۸	-	**96-Well plate**	۱ عدد	۱ عدد

موارد مورد نیازکه در داخل کیت موجود نیست:

- PBS (برای نمونه‌های سلولی)
- هموژنایزر شیشه‌ای (هموژنایزر نوند سلامت با کد محصول ۱۶۰۱۰)
- سانتریفیوژ
- میکروپلیت ریدر با قابلیت خوانش ۵۳۰ نانومتر

مراحل انجام آزمایش:

۱) آماده‌سازی نمونه‌ها:

- **نمونه‌های بافتی**: نمونه بافتی را ابتدا با PBS سرد شست و شو داده و در حدود ۵۰ تا ۱۰۰ میلی‌گرم از آن را وزن کرده و ۵۰۰ تا ۱۰۰۰ میکرولیتر از Lysing Buffer موجود در کیت را اضافه کنید. سپس توسط هموژنایزر شیشه‌ایی (استفاده از هموژنایزر نوند سلامت با کد محصول ۱۶۰۱۰ پیشنهاد می‌گردد) نمونه مورد نظر را هموژنایز کرده و در ۱۰۰۰۰ دور به مدت ۱۰ دقیقه سانتریفیوژ کنید (نوند سلامت در این مرحله استفاده از سانتریفیوژ یخچال‌دار را توصیه می‌کند). در ادامه مایع رویی را جدا کرده و به عنوان نمونه استفاده نمائید.
- **نمونه‌های سلولی**: تعداد $۱۰^{۷}$ سلول را پس از شستشو با PBS با یک میلی‌لیتر Lysing Buffer هموژن کرده و پس از سانتریفیوژ در ۱۰۰۰۰ دور به مدت ۱۰ دقیقه، مایع رویی را جدا کرده و به عنوان نمونه استفاده نمائید.
- **نمونه های بیولوژیکی شامل سرم، پلاسما و ادرار:** نیازی به آماده‌سازی ندارند. توجه داشته باشید در صورت استفاده از پلاسما، نمونه نباید حاوی EDTA باشد.

Copyright © 2022 Navand Salamat. All rights reserved

۲) آماده سازی محلول کار:

نکته: نیم ساعت قبل از شروع آزمایش معرف‌ها را به دمای اتاق (۲۰ تا ۲۴ درجه سانتی‌گراد) برسانید.

نکته: معرف دو (**Reagent 2**) قبل از هر بار مصرف باید ورتکس شده و محلول همگن بدست آید.

- **آماده سازی محلول استاندارد:** مقدار ۱۰ میکرولیتر از محلول استاندارد موجود در کیت را با ۱۰ میلی‌لیتر آب دیونیزه مخلوط کنید. غلظت استاندارد به دست آمده ۱۰ میلی‌مول بوده و برای رسم منحنی استاندارد طبق روش زیر غلظت‌های مختلف را تهیه نمائید. ماندگاری محلول آماده شده استاندارد یک ساعت می‌باشد.

ابتدا به یک میکروتیوب مقدار ۱ میلی لیتر از استاندارد ۱۰ میلی مول اضافه کنید. سپس به ۴ عدد میکروتیوب دیگر مقدار ۵۰۰ میکرولیتر آب دیونیزه اضافه کنید. در مرحله بعد مقدار ۵۰۰ میکرولیتر از استاندارد ۱۰ میلی‌مول میکروتیوب اول را به میکروتیوب شماره ۲ اضافه کرده و خوب مخلوط کنید. سپس ۵۰۰ میکرولیتر از میکروتیوب شماره ۲ برداشته و به میکروتیوب شماره ۳ اضافه کنید و این کار را تا میکروتیوب آخر ادامه دهید. غلظت های استاندارد به دست آمده به ترتیب ۱۰ - ۵ - ۲/۵ - ۱/۲۵ - ۰/۶۲۵ میلی مول می‌باشد.

۳) روش کار:

A. مقدار ۳۰ میکرولیتر از استاندارد یا نمونه را به چاهک اضافه کنید

B. مقدار ۲۰۰ میکرولیتر از Reagent 1 به چاهک نمونه/استاندارد اضافه کرده و شیک نمایید.

C. سپس مقدار ۱۰ میکرولیتر از Reagent 2 (ورتکس در هر بار استفاده ضروری می باشد) به نمونه و یا چاهک‌های حاوی استاندارد اضافه کنید و به مدت ۲۰ دقیقه انکوبه نمایید.

D. بعد از ۲۰ دقیقه جذب نوری نمونه/استاندارد را در طول موج ۵۳۰ نانومتر قرائت کنید (در میکروپلیت ریدرهایی که فیلتر ۵۳۰ ندارند از فیلتر ۴۹۰ نانومتر نیز می‌توان استفاده نمود).

۴) محاسبات:

با استفاده از نرم‌افزارهای آماری همچون اکسل، نمودار منحنی استاندارد غلظت‌های مختلف را به دست آورده و با توجه به فرمول خط وضعیت اکسیدانی کل را محاسبه نمائید.

فرمول خط حاصل از غلظت‌های مختلف استاندارد به صورت زیر خواهد بود:

$$y=Ax+B$$

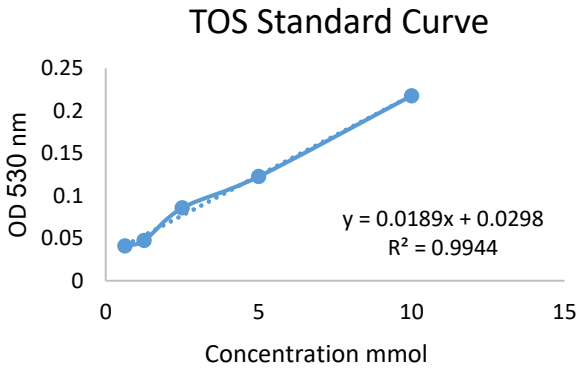
y: جذب نوری استاندارد

A: شیب خط (مثال در فرمول نمودار مقابل این عدد برابر با ۰/۰۱۸۹ می‌باشد)

x: غلظت استاندارد (H_2O_2)

B: عرض از مبدا (مثال در فرمول نمودار مقابل این عدد برابر با ۰/۰۲۹۸ می‌باشد)

واحد ظرفیت تام اکسیدانتی: µmol Equiv./L



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 و یا رسوبی 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 و یا استاندارد دوبار تکرار انجام گرفته و میانگین آن‌ها را به عنوان نتیجه نهایی گزارش کنید.
- هرگونه تغییر در مخلوط کردن، زمان یا دمای انکوبه و زمان مصرف کیت نتایج مختلفی را ارائه خواهد داد لذا توصیه می‌شود در تغییر هر یک از پارامترها، منحنی استاندارد جدیدی رسم شود.

Copyright © 2022 Navand Salamat. All rights reserved

- در صورتی‌که مقدار جذب نمونه OD بیشتر از بالاترین مقدار استاندارد باشد، نمونه‌ها رقیق شده و مجددا سنجش انجام گیرد.
- 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.
- 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.

۷) عیب‌یابی:

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
	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 سازي 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 از 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

- 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