کیت سنجش تیول تام

Natothiol™ Total Thiol Assay Kit

مقدمه:

تیول ترکیبی است که حاوی یک گروه سولفیدریل (C-SH-) با کربن است. تیول‌های طبیعی شامل ترکیباتی از قبیل گلوتاتیون، سیستئین و هموسیستئین هستند. که بزرگترین قسمت از کل مجموعه آنتی‌اکسیدانی موجود در حیوانات را شامل می‌شوند و بنابراین نقش مهمی در حفاظت از آسیب‌ها در برابر گونه‌های فعال اکسیژن ایفا می‌کنند. تیول‌ها می‌توانند در حالت آزاد یا در پل‌های سولفیدی همراه با مولکول‌های دیگر یا متصل به پروتئین‌ها از طریق گروه سولفیدریل سیستئین وجود داشته باشند. اگرچه تیول‌ها می‌توانند به پروتئین‌های مختلف متصل شوند اما بیشتر پروتئین‌های تیول متصل به آلبومین سرم در سیستئین ۳۴ هستند.

تیول‌ها علاوه بر نقش خود در محافظت در برابر استرس‌های رادیکال آزاد، در آپوپتوز، سیگنالینگ سلولی و سم‌زدایی سلول‌ها مهم هستند. اثرات اکسید نیتریک در بدن توسط S-nitrosylation پروتئین‌ها و یا پپتیدها برای تولید S-nitrosothiols (SNOs) کنترل می‌شود. شواهد حاکی از آن است که ناتوانی در کارآیی SNO ها بخشی از دلایل فشار خون بالا است. نارسایی مزمن کلیه با وضعیت کلی تیول در کلیه ارتباط دارد در نتیجه استرس اکسیداتیو به عنوان پاتوژنز در دیابت دخیل بوده و بیماران مبتلا به عوارض دیابت نوع ۲ سطوح پروتئین تیول کمتری در سرم نشان می‌دهند.

کیت سنجش تیول تام **Natothiol™** روشی ساده، تکرارپذیر و استاندارد برای اندازه‌گیری میزان تیول و آگاهی از خاصیت آنتی‌اکسیدانی آن در نمونه‌های بیولوژیکی مانند سرم، پلاسما، ادرار، بافت هموژنه، لیزات سلولی و مایع محیط کشت را فراهم می‌کند.

محتوای کیت:

ردیف	دمای نگهداری	نام ماده	۴۸ تست	۹۶ تست
۱	2-8 ºC	**Reagent 1a**	۱ ویال	۱ ویال
۲	2-8 ºC	**Reagent 1b**	۵۰۰ میکرولیتر	۵۰۰ میکرولیتر
۴	2-8 ºC	**Reagent 1c**	۱۰ میلی‌لیتر	۲۰ میلی‌لیتر
۵	2-8 ºC	**Assay Buffer**	۱۰۰ میلی‌لیتر	۱۰۰ میلی‌لیتر
۶	2-8 ºC	**Standard Solution**	۱ ویال	۱ ویال
۷	2-8 ºC	**Lysing Buffer**	۵۰ میلی‌لیتر	۱۰۰ میلی‌لیتر
۸	-	**96-Well plate**	۱ عدد	۱ عدد

موارد مورد نیازکه در داخل کیت موجود نیست:

- PBS (برای نمونه‌های سلولی)
- میکروتیوب و لوله آزمایش
- هموژنایزر شیشه‌ای (هموژنایزر نوند سلامت با کد محصول ۱۶۰۱۰)
- سانتریفیوژ
- میکروپلیت ریدر با قابلیت خوانش ۴۰۵ نانومتر

Copyright © 2022 Navand Salamat. All rights reserved

مراحل انجام آزمایش:

۱) آماده‌سازی نمونه‌ها:

- **پلاسما:** خون را با استفاده از یک ضد انعقاد مانند هپارین یا سیترات جمع آوری کنید. سپس در دمای ۴ درجه سانتی‌گراد به مدت ۱۰ دقیقه سانتریفیوژ کرده و مایع رویی را برای انجام سنجش استفاده کنید.
- **سرم:** خون را بدون استفاده از ضد انعقاد مانند هپارین یا سیترات جمع آوری کنید. اجازه دهید خون به مدت ۳۰ دقیقه در دمای ۲۵ درجه سانتی‌گراد لخته شود. سپس به مدت ۱۵ دقیقه با ۲۰۰۰ دور در دقیقه و در دمای ۴ درجه سانتی‌گراد سانتریفیوژ نمایید. مایع رویی را جهت انجام سنجش جمع‌آوری کنید.

  نکته: پلاسما و خون در دمای منفی ۸۰ درجه به مدت ۱ ماه پایدار خواهد بود. از فریز و یخ زدایی مجدد اجتناب نمایید.
- **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.

  توجه: در نمونه‌های سرم و اریتروسیت، در صورت مشاهده خوانش‌های بالای ۲، بهتر است رقیق‌سازی صورت گیرد و در محاسبات ضریب رقت وارد گردد.
- **نمونه‌های ادرار:** نمونه ادرار را با نسبت ۱ به ۵۰ با آب HPLC رقیق نمایید.

۲) آماده سازی محلول کار:

نکته ۱: نیم ساعت قبل از شروع آزمایش معرف‌ها را به دمای اتاق (۲۰ تا ۲۵ درجه سانتی‌گراد) رسانده و در صورت مشاهده کریستال، به‌وسیله ورتکس محلول را همگن کنید.

نکته ۲: حتما قبل از شروع آزمایش میزان pH محلول‌های R1c و Assay Buffer و Lysing Buffer را در بازه ۷/۴ تا ۸ تنظیم کنید. بدین منظور می‌توانید از NaOH استفاده کنید.

نکته ۳: حتما مقادیر تعیین شده در پروتکل را با ابزار مناسب (سمپلر، پیپت یا استوانه مدرج) انتقال دهید. برخی مواد ممکن است بیشتر از مقادیر نوشته شده بر روی لیبل بطری‌ها موجود باشند.

- **Reagent 1:** ابتدا مقدار ۵۰۰ میکرولیتر از Reagent 1b را به ویال Reagent 1a اضافه کنید. ماندگاری این محلول ۱ ماه در دمای ۴ درجه سانتی‌گراد است. سپس در یک لوله آزمایش تمیز و خشک مقدار ۱۰۰ میکرولیتر از محلول آماده‌شده را به ۴۹۰۰ میکرولیتر Reagent 1c اضافه کنید. ماندگاری این محلول (Reagent 1 آماده مصرف) به مدت ۱ روز است.
- **آماده سازی محلول استاندارد:** مقدار ۱۲ میلی لیتر از Assay Buffer را به ویال استاندارد (حاوی پودر) اضافه کنید. سپس مجددا با نسبت ۱ به ۸ با Assay Buffer رقیق نمایید (مثال: ۷ میلی‌لیتر Assay Buffer را به ۱ میلی لیتر از ویال استاندارد آماده شده اضافه کنید). ماندگاری محلول حاصل (محلول استاندارد آماده مصرف) ۲۴ ساعت است.

۳) منحنی استاندارد:

- مقدار ۲۰۰ میکرولیتر از Assay Buffer را به ۵ عدد میکروتیوب اضافه کنید. سپس مقدار ۲۰۰ میکرولیتر از محلول استاندارد حاصل را به میکروتیوب شماره ۱ اضافه کرده کاملا مخلوط کنید. ۲۰۰ میکرولیتر از محتویات میکروتیوب شماره ۱ برداشته و به میکروتیوب شماره ۲ اضافه کنید. این عمل را تا میکروتیوب شماره ۴ ادامه دهید (۲۰۰ میکرولیتر باقیمانده را دور بریزید). غلظت استاندارد (از میکروتیوب شماره ۱ تا ۵) به ترتیب ۸۶، ۴۳، ۲۱/۵، ۱۰/۷۵ و ۰ میکرومولار خواهد بود.

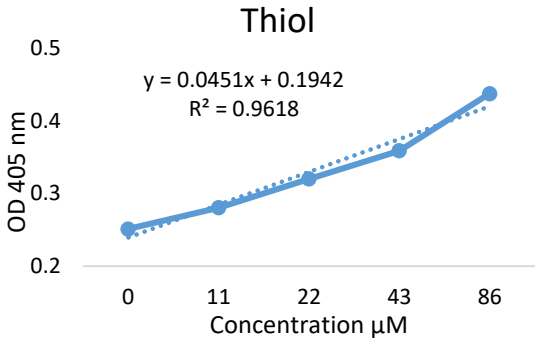
Copyright © 2022 Navand Salamat. All rights reserved

۴) روش کار:

- مقدار ۵۰ میکرولیتر استاندارد / نمونه به چاهک‌ها اضافه کنید.
- جهت شروع واکنش ۱۵۰ میکرولیتر از محلول Reagent 1 اضافه کرده و در کمتر از ۱۰ دقیقه در طول موج ۴۰۵ نانومتر قرائت نمایید.

۵) محاسبات:

با استفاده از نرم‌افزارهای آماری همچون اکسل، نمودار منحنی استاندارد غلظت‌های مختلف را به دست آورده و با توجه به فرمول خط میزان تیول تام 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 ۰/۰۴۵۱ می‌باشد)

x: غلظت استاندارد

B: عرض از مبدا (مثال در فرمول نمودار مقابل این عدد برابر با ۰/۱۹۴۲ می‌باشد)

با جاگذاری جذب نوری نمونه در نمودار خط، می‌توان غلظت تیول در نمونه را به دست آورد.

K × [عرض از مبدا + (غلظت تیول در نمونه × شیب خط)] = جذب نوری نمونه

K*: ضریب رقت

واحد سنجش تیول در نمونه عبارت است از: *µmol / L*

۶) توصیه‌ها:

- زمان قرائت جذب نوری، نتایج را تحت تاثیر قرار خواهد داد لذا زمان کمتر از ۱۰ دقیقه رعایت شود.
- ماندگاری محلول‌ها بعد از رقیق‌سازی کاهش می‌یابد، در زمان انجام سنجش و به مقدار مورد نیاز رقیق‌سازی انجام گیرد.
- 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.
- استفاده از سانتریفیوژ یخچالدار توصیه می‌شود.
- 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 است.

Copyright © 2022 Navand Salamat. All rights reserved

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 ریدر در طول موج نادرست	تنظیمات فیلتر دستگاه را چک نمایید
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 نمایید
	نمونه‌های کشت بافت/سلول به صورت کامل هموژن نشده باشند	هموژن کردن نمونه را تکرار نمایید. مدت زمان مرحله‌ی همگن‌سازی 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 نمایید
	وجود ماده‌ی مداخله گر در نمونه	در صورت امکان نمونه را بیشتر رقیق نمایید
	استفاده از نمونه‌های 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 نامناسب 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 معرف‌ها 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 آماده‌سازی محلول واکنش، همه اجزاء را به دمای مناسب رساتده سپس دوباره ترکیب نمایید
	خطاهای مرتبط با پیپت کردن در آماده سازی محلول‌های استاندارد	از حجم‌های بالا استفاده نمایید
	خطاهای پیپت کردن در محلول واکنش	محلول کار را هر زمان که ممکن است حاضر نمایید
	تشکیل حباب‌های هوا در چاهک‌ها	محتویات پیپت را به آرامی در چاهک‌ها 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	نمونه‌ها در طول موج نادرست خوانده شوند	تنظیمات فیلتر و دستگاه را بررسی نمایید
	نمونه‌ها دارای محتویات مداخله گر باشند	در صورت امکان نمونه را بیشتر رقیق نمایید
	خواندن نمونه در بالا / زیر محدوده خطی	نمونه‌های 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