



کیت سنجش نیتریک اکساید Natrix™ Nitric Oxide (NO) Assay Kit

مقدمه:

نیتریک اکسید (NO) واسطه مولکولی بسیاری از فرآیندهای فیزیولوژیکی مانند گشادی عروق، التهاب، ترومبوز، ایمنی و انتقال عصبی می‌باشد. نیتریک اکسید، توسط آنزیم نیتریک اکساید سنتاز (NOS) از L-آرژنین، اکسیژن، و NADPH ساخته شده و به وسیله‌ی مهار انقباض عضله صاف عروق، تجمع پلاکتی و چسبندگی لکوسیت‌ها به اندوتلیوم در هومئوستاز عروق شرکت دارد. افراد مبتلا به آترواسکلروز، دیابت و فشار خون بالا اغلب در مسیرهای NO اختلالاتی را نشان می‌دهند.

روش‌های مختلفی جهت اندازه‌گیری NO در سیستم‌های بیولوژیکی طراحی شده است که یکی از این روش‌ها شامل استفاده از واکنش دیونیزه کردن و تشخیص با اسپکتروفتومتری است که نیتريت تولید شده توسط اکسیداسیون NO تحت شرایط فیزیولوژیکی را می‌سنجد. واکنش Griess نیز می‌تواند برای آنالیز نیترات از طریق کاهش کاتالیزوری آن به نیتريت استفاده شود.

کیت Natrix™، بر اساس روش Griess بوده که این روش، روشی ساده، تکرارپذیر و استاندارد برای اندازه‌گیری NO در نمونه‌های بیولوژیکی مانند سرم، پلاسما، بافت هموزنه و لیزسلولی را فراهم می‌کند. در این روش مقدار نیتریک اکساید به طور غیرمستقیم سنجیده می‌شود بدین صورت که اسیدسولفانلیک به واسطه واکنش با نیتريت در محلول اسیدی یک رنگ آزو را تشکیل می‌دهد که می‌تواند در جذب نوری ۵۲۰ تا ۵۹۰ نانومتر اندازه‌گیری شود.

محتوای کیت:

ردیف	دمای نگهداری	نام ماده	تست ۴۸	تست ۹۶	تست ۱۹۲
۱	2-8 °C	Reagent 1	۳ میلی‌لیتر	۵ میلی‌لیتر	۱۰ میلی‌لیتر
۲	2-8 °C	Reagent 2	۳ میلی‌لیتر	۵ میلی‌لیتر	۱۰ میلی‌لیتر
۳	2-8 °C	Standard solution	۲ میلی‌لیتر	۲ میلی‌لیتر	۴ میلی‌لیتر
۴	2-8 °C	Buffer A	۴ میلی‌لیتر	۸ میلی‌لیتر	۱۶ میلی‌لیتر
۵	2-8 °C	Buffer B	۴ میلی‌لیتر	۸ میلی‌لیتر	۱۶ میلی‌لیتر
۶	-	96-Well plate	۱ عدد	۱ عدد	۲ عدد

موارد مورد نیاز که در داخل کیت موجود نیست:

- میکروپلیت ریدر با قابلیت خوانش ۵۷۰ نانومتر
- PBS (برای نمونه‌های بافتی)
- هموژنایزر شیشه‌ای (در صورت استفاده از بافت به عنوان نمونه)
- سانتریفیوژ

مراحل انجام آزمایش:

۱) آماده‌سازی نمونه‌ها:

- **نمونه‌های بافتی:** برای آماده‌سازی نمونه‌های بافتی، ۲۰ میلی‌گرم از بافت را با ۲۰۰ میکرولیتر PBS (pH=7.4) خنک هموزن کرده و به مدت ۱۰ دقیقه با دور ۱۳۰۰۰ سانتریفیوژ کنید. مایع رویی را جدا و پروتئین آن را به روشی که در ادامه به آن پرداخته می‌شود، رسوب دهید.
- **نمونه‌های کشت سلولی:** برای آماده‌سازی نمونه‌های سلولی، ۲×۱۰^۶ سلول را پس از حذف محیط کشت آن به وسیله سانتریفیوژ، در ۲۰۰ میکرولیتر PBS (pH=7.4) هموزن کرده و به مدت ۱۰ دقیقه با دور ۱۳۰۰۰ سانتریفیوژ کنید. مایع رویی را جدا و پروتئین آن را به روشی که در ادامه به آن پرداخته می‌شود، رسوب دهید.



- نمونه‌های ادرار و بزاق: نمونه‌های ادرار و بزاق نیازی به رسوب پروتئین ندارند ولی نمونه ادرار به دلیل داشتن نیترات زیاد، باید رقیق شود که توصیه می‌شود حداقل ۱:۱۰ رقیق شود.
- نمونه‌های سرمی و پلاسما: پروتئین آن را به روشی که در ادامه به آن پرداخته می‌شود، رسوب دهید.

(۲) آماده‌سازی محلول‌ها:

- محلول استاندارد موجود در کیت را به نسبت ۱ به ۱۰ رقیق کنید که محلول رقیق شده، غلظت ۱۰۰ میکرومولار استاندارد را خواهد داشت.
- محتویات درون کیت (به جز استاندارد) آماده مصرف می‌باشند.

(۳) روش کار:

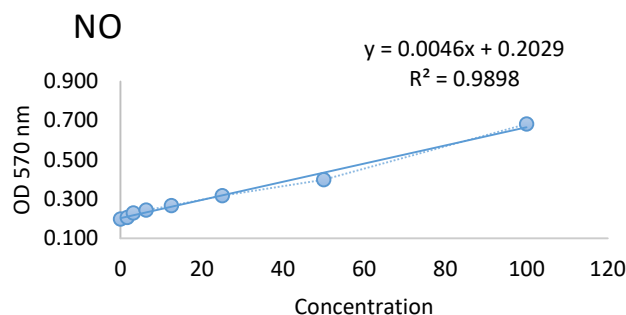
- برای شروع آزمایش، تمام محلول‌های کیت را به منظور رسیدن به تعادل دمایی به مدت ۱۵ تا ۳۰ دقیقه در دمای اتاق قرار دهید.
- در صورت مشاهده کریستال در معرف‌ها، آن را تا دمای ۵۰ درجه (توسط بن‌ماری) گرم کنید و پس از ورتکس استفاده نمایید.
- در ابتدا برای افزایش دقت و حذف مداخله‌گرهای آزمایش باید پروتئین نمونه‌های سرم، پلاسما، خون کامل، بافت و سلول‌ها رسوب داده شود. بدین منظور ۱۵۰ میکرولیتر از نمونه را با ۸۰ میکرولیتر از بافر A (Buffer A) موجود در کیت، درون یک میکروتیوب ۱.۵ میلی‌لیتری مخلوط کرده و پس از ورتکس کامل، ۸۰ میکرولیتر از بافر B را اضافه و ورتکس نمائید. پس از مخلوط کامل، آن را به مدت ۱۰ دقیقه در سانتریفیوژ با دور ۱۴۰۰۰ قرار داده و سپس مایع رویی آن را جدا و به عنوان نمونه استفاده نمائید (در تمام مراحل استفاده از سانتریفیوژ یخچال دار توصیه می‌شود).
- با توجه به تنوع نمونه‌های بیولوژیکی و افزایش دقت در اندازه‌گیری، پیشنهاد می‌شود ۳ نمونه از نمونه‌های خود را طبق روش کار که در ادامه به آن پرداخته می‌شود، انجام داده و میانگین آن‌ها را محاسبه نمائید. اگر نتایج در بازه ۱ تا ۱۰۰ میکرومول قرار گرفتند مابقی نمونه‌ها را نیز به همان روش انجام دهید، در غیر اینصورت به نسبت افزایش بیش از ۱۰۰ میکرومول در نمونه‌ها می‌توانید آنها را رقیق نموده و در آخر ضریب رقت را در نتایج اعمال نمایید. برای مثال اگر میانگین نمونه‌ها ۱۵۰ میکرومول باشد پیشنهاد می‌شود نمونه‌ها دو برابر رقیق شوند.
- سه ستون (۲۴ چاهک) از میکروپلیت ۹۶ چاهکی را برای منحنی مرجع استاندارد نیتریت تعیین کنید (دایره‌های تیره در شکل). ۵۰ میکرولیتر آب دوبار تقطیر را به چاهک‌های ردیف B-H اضافه کنید. ۱۰۰ میکرولیتر از محلول استاندارد ۱۰۰ میکرومولار آماده شده را به ۳ چاهک باقی‌مانده در ردیف A اضافه کرده و در ادامه ۵۰ میکرولیتر از چاهک بالایی (ردیف A) را به چاهک پائینی اضافه نموده و این کار را به صورت سریالی تا ردیف G ادامه دهید تا غلظت‌های ۱۰۰، ۵۰، ۲۵، ۱۲/۵، ۶/۲۵، ۳/۱۳ و ۱/۵۶ میکرومولار را داشته باشید. در پایان این مرحله چاهک‌های ردیف H فقط حاوی آب دیونیزه خواهند بود.
- F. برای اندازه‌گیری NO در نمونه‌ها به میزان ۵۰ میکرولیتر از هر نمونه را در چاهک‌های رنگ روشن مطابق شکل بریزید.

محل نمونه‌های مورد آزمایش		عمل قرارگیری
		غلظت‌های مختلف
		استاندارد نیتریت
		غلظت NO ₂ (μM)
۱۰۰	A	● ● ● ●
۵۰	B	● ● ● ●
۲۵	C	● ● ● ●
۱۲.۵	D	● ● ● ●
۶.۲۵	E	● ● ● ●
۳.۱۳	F	● ● ● ●
۱.۵۶	G	● ● ● ●
۰	H	● ● ● ●

- G. از معرف R1 به میزان ۵۰ میکرولیتر به همه چاهک‌ها (تیره و روشن) اضافه و مخلوط نمائید سپس به مدت ۱۰ دقیقه دور از نور و در دمای اتاق انکوبه نمائید.
 - H. بعد از انکوباسیون، معرف R2 را به میزان ۵۰ میکرولیتر به هر چاهک (تیره و روشن) اضافه نموده و مخلوط نمائید. (نوند سلامت به منظور مخلوط کردن، انجام Pipetting را توصیه می‌کند).
 - I. ۱۰ دقیقه پس از مخلوط کردن معرف‌ها، پلیت را در طول موج ۵۷۰ نانومتر در مقابل بلانک (50 μl R1 + 50 μl R2 + 50 μl DW) قرائت نمائید. حداکثر مدت زمان پایدار بودن رنگ محلول‌ها ۳۰ دقیقه است.
- توجه:** حجم نهایی در هر چاهک ۱۵۰ میکرولیتر بوده و برای سنجش محدوده غلظت نیتریت ۰ تا ۱۰۰ میکرومولار است.

(۴) رسم منحنی:

- با استفاده از نتایج به دست آمده منحنی استاندارد را رسم و از آن برای تعیین میزان غلظت نیتریک اکساید در نمونه مورد نظر استفاده نمائید و یا اینکه از فرمول خط حاصل از منحنی استاندارد نیز می‌توانید برای تعیین غلظت نیتریک اکساید موجود در نمونه‌ها استفاده نمائید.



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

$$y = Ax + B$$

y: جذب نوری استاندارد

A: شیب خط (مثال در فرمول خط مقابل: ۰/۰۰۴۶ می باشد)

x: غلظت استاندارد (μM)

B: عرض از مبدا (مثال در فرمول خط مقابل: ۰/۲۰۲۹ می باشد)

واحد سنجش نیتریک اکساید: μM

۵) توصیه ها:

- ممکن است یک پژوهشگر نتایج متفاوت از آزمایش مشابه به دست بیاورد. به منظور بهتر شدن نتایج، توصیه می شود از هر نمونه دوبار تکرار انجام گرفته و میانگین آن ها را به عنوان نتیجه نهایی گزارش کنید.
- قبل از شروع آزمایش، از کافی بودن مقدار نمونه ها و محلول ها اطمینان حاصل کنید.
- کیت های 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 معرف ها، مواد و دستگاه ها در زمان مناسب آماده می شوند.
- در زمان کار با کیت رعایت اصول ایمنی آزمایشگاهی الزامی می باشد.

۶) عیب یابی:

مشکل	احتمالات موجود	راه حل های پیشنهادی
عدم کارکرد سنجش یا آزمایش	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
	سرد بودن بافر آزمایش	دمای بافر باید به دمای اتاق رسیده باشد
نمونه ها 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
	استفاده از نمونه های چند بار دفریز شده	اگر نمونه ها چندین بار مورد استفاده قرار خواهند گرفت آن های را به دو یا سه قسمت تقسیم نمایید
	نمونه های کشت بافت/سلول به صورت کامل هموژن نشده باشند	هموژن کردن نمونه را تکرار نمایید. مدت زمان مرحله همگن سازی را افزایش دهید
خوانش بالا / پایین در نمونه ها و استانداردها	استفاده از نمونه های قدیمی یا نامناسب	از نمونه های تازه استفاده کرده و تا زمان استفاده به درستی نگهداری شود
	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 معرف ها	تاریخ انقضای کیت را چک نموده و معرف ها را در شرایط مناسب نگهداری نمایید
منحنی استاندارد غیر خطی	استفاده از حجم های نامناسب	از سمپلر کالیبره شده استفاده نموده و مواد را تقسیم نمایید
	استفاده از ترکیبات نیمه گرم شده	قبل از آماده سازی محلول واکنش، همه اجزاء را به دمای مناسب رسانده سپس دوباره ترکیب نمایید
	خطاهای مرتبط با پیپت کردن در آماده سازی محلول های 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 چاهک ها	محتویات پیپت را به آرامی در چاهک ها خالی نمایید
نتایج غیر منتظره	غلظت محلول استاندارد نادرست است	به دستورالعمل استاندارد رقت در پروتکل مراجعه کنید
	خطاهای محاسبات	بعد مراجعه به پروتکل، محاسبات را دوباره انجام دهید
	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 شده اید، 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 پله های پیشرفت و بهبود کیفیت را در نوند سلامت تشکیل می دهند. لذا در صورت وجود هرگونه نظر، انتقاد یا پیشنهاد، لطفاً آن را از طریق ایمیل hi@navandsalamat.com با ما در میان بگذارید.