

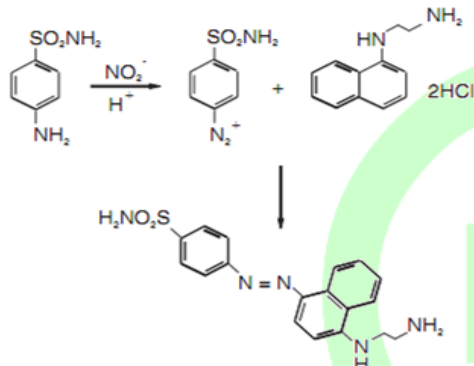
کیت سنجش نیتریک اکساید

مقدمه

نیتریک اکساید از اکسیداسیون درون سلولی ال- آرژینین توسط نیتریک اکساید سنتتازها تولید می شود. نیتریک اکساید در بسیاری از فرایندهای فیزیولوژیک از جمله تنظیم گشادی-تنگی عروق، ارتباط سلولهای عصبی و پاسخهای ایمنی شرکت دارد. اکسید نیتریت به شدت ناپایدار است و در اثر اکسیداسیون به نیترات و نیتریت تبدیل می شود که می توان مقدار آن را به روش رنگ سنجی گریس تعیین نمود.

اساس سنجش نیتریت به روش گریس

در این روش مقدار نیتریت موجود در سوپرناتانت کشت سلول یا سرم با واکنش گریس تعیین می گردد. طی مرحله اول واکنش گریس نیتریت با اسید سولفانیلک واکنش داده و یون دی آزونیوم تولید می کند. در مرحله دوم واکنش، این یون با ترکیب ان-1- نفتیل (نفتیل) اتیلن دی آمین جفت شده و ترکیبی از مشتقات ازو به رنگ صورتی تولید می کند.



مواد فراهم شده در کیت

مواد زیر یک بسته در دمای 4 درجه سانتیگراد تحویل داده می شود. توجه کنید که این مواد مصرف تحقیقاتی دارند و نباید برای تشخیص یا درمان در حیوان و انسان مورد استفاده قرار گیرند.

نام ماده	مقدار موجود برای 200 تست	شرایط نگهداری
Standard	2.5ml/vial (2000 $\mu\text{mol/ml}$)	4°C, dark
Reagent A	10ml/vial	4°C, dark
Reagent B	10ml/vial	4°C, dark
Dilution Buffer	10ml/vial	4°C, dark
Mixing bottle	2 bottle (10ml/bottle)	4°C, dark
96 wells plate	2 plates	

سایر مواد و وسایل مورد نیاز که در کیت نیستند

- 1- سمپلر و سر سمپلر برای حجمهای 10 تا 1000 میکرولیتری
- 2- 8 میکروتیوب برای تهیه رفتهای مناسب از استاندارد
- 3- دستگاه میکروپلیت ریدر مجهز به فیلتر 540 نانومتر و پلیت متناسب با دستگاه

شرایط نگهداری

لطفاً پس از دریافت کیت مواد موجود در آن را بر اساس شرایط نور و دمای بهینه ای که روی هر ویال نوشته شده نگهداری کنید. دقت کنید که از مخلوط Reagent A و Reagent B در ظرف تاریک تنها می توان به مدت یک ماه نگهداری کرد. در صورت نگهداری مناسب تا یکسال می توانید از مواد کیت استفاده کنید.

روش آزمایش

A- تهیه رقت های استاندارد

- 1- 8 میکروتیوب 1.5 میلی لیتری بردارید و A تا H نام گذاری کنید. مقدار 300 میکرولیتر Dilution buffer در تیوب های B تا H بریزید.
- 2- 300 میکرولیتر از محلول استاندارد در تیوب A بریزید.
- 3- 300 میکرولیتر از محلول استاندارد در تیوب B بریزید. خوب با سمپلر پیپت کنید و 300 میکرولیتر از آن را به لوله C انتقال دهید تا غلظت استاندارد 100 میکرومول به دست آید.
- 4- همانند مرحله 3 به تهیه رقت از لوله D تا G ادامه دهید. در لوله H چیزی نریزید تا از آن برای Blank استفاده شود.








5- مطابق شکل زیر مقدار 100 میکرولیتر از هر لوله را به صورت 3 تایی در چاهک پلیت 96 خانه بریزید.

	Nitrate standards			Samples																	
	#1	#2	#3																		
A	200 μ M	200 μ M	200 μ M																		
B	100 μ M	100 μ M	100 μ M																		
C	50 μ M	50 μ M	50 μ M																		
D	25 μ M	25 μ M	25 μ M																		
E	12.5 μ M	12.5 μ M	12.5 μ M																		
F	6.25 μ M	6.25 μ M	6.25 μ M																		
G	3.13 μ M	3.13 μ M	3.13 μ M																		
H	Blank	Blank	Blank																		

B- انجام آزمایش

- 1- نمونه های سوپر ناتانت سلولی یا سرم را پس از جمع آوری سانتریفوژ کنید تا ذرات ریز و سلولها از آن حذف گردد. سپس تا زمان جمع شدن کامل نمونه ها، آنها را در دمای 20- و در صورت امکان 70- نگهداری کنید.
- 2- هنگام انجام آزمایش نمونه را به دمای اتاق برسانید. نمونه های سرم را با Dilution buffer به نسبت 1:2 رقیق کنید. از نمونه های سوپر ناتانت سلولی یا سرم رقیق شده مقدار 100 میکرولیتر به صورت 3 تایی در هر چاهک پلیت 96 خانه بریزید.
- 3- برای تهیه معرف برای سنجش نیتریک اکساید در 96 چاهک (یک پلیت) ، مقدار 5 میلی لیتر از Reagent A را با مقدار 5 میلی لیتر از Reagent B در Mixing bottle مخلوط کنید و به آرامی هم بزنید تا محلول یکنواخت شود ولی کف نکند. دقت کنید هنگام برداشتن محلول، Reagent های A و B در ظروف اصلی با هم مخلوط نشوند. دقت کنید که اگر می خواهید در چند نوبت سنجش نیتریک اکساید را انجام دهید، یکبارهمه Reagent A و Reagent B را با هم مخلوط نکنید. چون پس از مخلوط شدن به شرط نگهداری در تاریکی تنها تا یک ماه قابل استفاده خواهند بود.
- 4- به هر چاهک دارای نمونه استاندارد، Blank و تست، 100 میکرولیتر از معرف را اضافه کنید. با دست یا با استفاده از شیکر کمی تکان دهید تا یکنواخت شود.
- 5- با استفاده از میکروپلیت ریدر، جذب نمونه ها را در 570 نانومتر بخوانید.

علائم و نشانه ها

	تنها برای مصرف in vitro
	در تاریکی نگهداری شود
	محدوده دمای نگهداری
	نشانه استریل بودن
	توجه به دستورالعمل
	تاریخ انقضا
	نام و نشانی شرکت سازنده

شرکت سیب زیست فن

مرکز رشد واحدهای فناور دانشگاه الزهراء
 تهران، ده ونک، مرکز رشد دانشگاه، واحد 2
 تلفن: 2782- (9-88044051)-021
 فکس: 021-88052325
 وب سایت: www.cibbiotech.com
 پست الکترونیک: info@cibbiotech.com