



کیت سنجش فعالیت آنزیم میلوپراکسیداز Nampox™ Myeloperoxidase (MPO) Activity Assay Kit

مقدمه:

میلوپروکسیداز (MPO) آنزیمی از نوع پراکسیداز است که تشکیل اسیدهیپوکلرو را کاتالیز می‌کند و در گرانول‌های آروپیل لکوسیت‌ها مخصوصاً در نوتروفیل‌ها ذخیره می‌شود. این آنزیم در واکنش‌های التهابی آزاد شده و می‌تواند مارکری برای فعالیت نوتروفیل‌ها در آماس باشد. MPO خاصیت میکروب‌کشی قوی داشته و گاهی به عنوان نشانگر برای لوسمی حاد نیز استفاده می‌شود. تحقیقات نشان می‌دهند که MPO را می‌توان به عنوان نشانگر التهاب شناخت. یافته‌های اخیر نشان می‌دهد که MPO در آسیب‌شناسی آتروژنز از طریق اکسیداسیون آپولیپوپروتئین A1 و تشکیل HDL معیوب و تغییر توانایی آن در اتصال و حذف کلسترول آزاد از بافت‌های محیطی نقش مهمی ایفا می‌کند.

اساساً فعالیت میلوپراکسیداز بر مبنای واکنش تترامتیل بنزدین (TMB) و پراکسید هیدروژن بوده و در طول موج ۶۵۰ نانومتر قابل سنجش می‌باشد.

کیت سنجش فعالیت میلوپراکسیداز (Nampox™) شرکت نوند سلامت، روشی ساده، تکرارپذیر و استاندارد برای اندازه‌گیری میزان فعالیت پراکسیدی میلوپراکسیداز است که در نمونه‌های بیولوژیکی مانند سرم، پلاسما، ادرار، بافت هموژنه و لیزات سلولی استفاده می‌شود.

محتوای کیت:

ردیف	دمای نگهداری	نام ماده	تست ۴۸	تست ۹۶
۱	2-8 °C	Reagent 1	۲۵۰ میکرولیتر	۵۰۰ میکرولیتر
۲	2-8 °C	Reagent 2a	۲ ویال	۲ ویال
۳	2-8 °C	Reagent 2b	۸۵۰ میکرولیتر	۸۵۰ × ۲ میکرولیتر
۴	2-8 °C	Reagent 2c	۱۵ میلی‌لیتر	۲۰ میلی‌لیتر
۵	2-8 °C	Sample Buffer 2X	۲۵ میلی‌لیتر	۵۰ میلی‌لیتر
۶	2-8 °C	Assay Buffer	۱۵ میلی‌لیتر	۱۵ میلی‌لیتر
۷	-	96-Well plate	۱ عدد	۱ عدد

موارد مورد نیاز که در داخل کیت موجود نیست:

- میکروپلیت‌ریدر با قابلیت اندازه‌گیری جذب (OD) ۶۵۰ نانومتر
- هموژنایزر شیشه‌ای (در صورت استفاده از بافت به عنوان نمونه)
- فسفات بافر (در صورت استفاده از بافت به عنوان نمونه)
- سانتریفوژ

مراحل انجام آزمایش:

۱) آماده‌سازی محلول کار:

- **Sample Buffer 2X**: برای آماده‌سازی بافر برای استفاده در نمونه‌های بافتی و یا سلولی، بافر موجود در کیت را به نسبت ۱:۱ با آب دیونیزه مخلوط و از رسیدن محلول به pH=6 اطمینان حاصل کنید (نوند سلامت استفاده از HCL را برای تنظیم pH توصیه می‌کند). بافر آماده شده **Sample Buffer 1X** حاوی ۵٪ درصد هگزادسیل تری‌متیل آمونیوم بروماید می‌باشد.



- **Reagent 1:** این معرف را قبل از انجام آزمایش و به صورت تازه تهیه نمائید. بدین صورت که ۷ میکرولیتر از معرف R1 موجود در کیت را با ۱۰۰ میلی‌لیتر آب مقطر دیونیزه مخلوط و استفاده کنید. ماندگاری معرف آماده‌شده در دمای اتاق، ۱ ساعت است.
- **Reagent 2:** برای آماده‌سازی معرف ۲، در ابتدا ۴۲۵ میکرولیتر از R2b (برای کیت ۹۶ تستی ۸۵۰ میکرولیتر) را به بطری R2a (حاوی پودر) اضافه نموده و پس از حل کردن پودر داخل بطری، به آن ۲۳۷۵ میکرولیتر (برای کیت ۹۶ تستی ۴۷۵۰ میکرولیتر) از R2c اضافه کنید. مخلوط حاصل را ورتکس کرده و پس از اطمینان از pH=۵/۴، به عنوان معرف ۲ آماده شده (R2) در روش کار از آن استفاده نمائید (نوند سلامت استفاده از HCL را برای تنظیم PH توصیه می‌کند). ماندگاری معرف آماده شده R2 در یخچال (۲-۸ درجه سانتی‌گراد) ۴۸ ساعت است.
- سایر معرف‌ها نیاز به آماده‌سازی نداشته و آماده مصرف هستند.

۲) آماده‌سازی نمونه‌ها:

نمونه‌های بافتی: در ابتدا حدود ۱۰ تا ۲۰ میلی‌گرم از نمونه را وزن کرده و پس از شستشوی کامل با PBS سرد، با یک میلی‌لیتر از Sample Buffer_{1x} (سرد) آماده شده، هموژن نمائید. سپس در ۱۰۰۰۰ دور به مدت ۱۰ دقیقه سانتریفیوژ (نوند سلامت در این مرحله استفاده از سانتریفیوژ یخچالدار را توصیه می‌کند) کرده و برای انجام آزمایش از مایع‌رویی به عنوان نمونه استفاده نمائید. توجه داشته باشید که مایع‌رویی تا زمان استفاده باید روی یخ یا در یخچال نگهداری شود.

نمونه‌های سلولی: ۲×۱۰^۶ سلول در یک میلی‌لیتر Sample Buffer_{1x} هموژن کرده و سپس در ۱۰۰۰۰ دور به مدت ۱۰ دقیقه سانتریفیوژ کنید. از محلول‌رویی به عنوان نمونه استفاده کنید. توجه داشته باشید که برای جداسازی سلول‌ها از کف پلیت، از مواد پرتئولیتیک (مانند تریپسین) استفاده نکنید.

نمونه‌های ادرار، سرم و یا پلاسما: قبل از شروع آزمایش نمونه مورد نظر را ده برابر با Sample Buffer_{1x} (رقیق شده) مخلوط کرده و از مخلوط حاصل به عنوان نمونه استفاده نمایید (مثال: ۱۰۰ میکرولیتر نمونه با ۹۰۰ میکرولیتر از Sample Buffer_{1x} مخلوط نمایید)

۳) روش کار:

- A. برای شروع آزمایش ۱۰ میکرولیتر از نمونه (ادرار، سرم، بافت، لیز سلولی) را با ۸۰ میکرولیتر از R1 رقیق شده مخلوط کرده و سپس ۱۱۰ میکرولیتر از R2 آماده شده را به مخلوط اضافه نمائید.
- B. پلیت را با میکروپلیت ریدر در طول موج ۶۵۰ نانومتر (۶۳۰ تا ۶۵۰ نانومتر) در دقیقه اول و پنجم قرائت و یادداشت نمائید.

۵) محاسبات:

با استفاده از فرمول زیر، ΔAbs_{650nm} را محاسبه و در فرمول بعدی وارد نمایید:

$$\Delta Abs_{650nm} = \left[\frac{Abs_{650nm} \text{ Time } 5 \text{ min} - Abs_{650nm} \text{ Time } 1 \text{ min}}{4} \right]$$

$$MPO \text{ activity} = \frac{\Delta Abs_{650nm}}{(\epsilon \times 1000)} \times 40$$

ε و یا ضریب خاموشی برای TMB در ۶۵۰ نانومتر معادل $3.9 \times 10^4 M^{-1} cm^{-1}$ بوده و در فرمول بالا قرار می‌گیرد.

واحد فعالیت آنزیم میلوپراکسیداز عبارت است از: $mmol / min / ml (mg)$ و یا mU / ml

توجه: در مورد نمونه‌های سرم و پلاسما که با Sample Buffer_{2x} مخلوط شده‌اند عدد به دست آمده در فرمول را باید به ۱۰ ضرب نمائید و در سایر موارد اگر نمونه‌ها را رقیق نموده‌اید باید در فرمول ضریب رقت را اعمال نمایید.



۵) توصیه‌ها:

- محتویات کیت در یخچال (دمای ۲-۸ درجه سانتی‌گراد) نگهداری شود، اما معرف‌ها قبل از شروع آزمایش باید به دمای محیط (ترجیحاً دمای ۲۰ درجه سانتی‌گراد) رسیده و قبل از استفاده ورتکس نمائید به گونه‌ای که هیچ کریستالی در معرف‌ها دیده نشود.
- نمونه‌ها پس از آماده‌سازی باید تا زمان انجام آزمایش در یخچال و یا روی یخ نگهداری شوند.
- از ایجاد کف و یا حباب در موقع مخلوط کردن مواد به جد پرهیز نمائید.
- اسید اسکوربیک و و اسید اوریک در نمونه‌ها، می‌توانند به عنوان مهارکننده میلوپراکسیداز عمل کرده و نتایج آزمون را تغییر دهند.
- ممکن است یک پژوهشگر نتایج متفاوت از آزمایش مشابه به دست بیاورد. توصیه می‌شود از هر نمونه ۳ بار تکرار انجام دهید و میانگین آن‌ها را به عنوان نتیجه نهایی در نظر بگیرید.
- رعایت زمان‌های ذکر شده در روش کار به خاطر اندازه‌گیری فعالیت آنزیم ضروری می‌باشد.
- در نمونه‌های بافتی و لیزات سلولی اندازه‌گیری پروتئین نیز توصیه می‌شود که می‌توانید بدین منظور از کیت **Nadfred™** نوند سلامت استفاده نمائید.
- 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 دقیقاً 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.
- 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 دقیقاً پیروی نمایید
	پلیت ریدر در طول موج نادرست	تنظیمات فیلتر دستگاه را چک نمایید
نمونه‌ها با قرائت (خوانش) نامنظم یا نامعقول	آماده‌سازی نمونه‌ها با بافر نادرست	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	هموژن کردن نمونه را تکرار نموده و مدت زمان مرحله‌ی همگن‌سازی را افزایش دهید
	استفاده از نمونه‌های چند بار دفریز شده	اگر نمونه‌ها 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
خوانش بالا و یا پایین در نمونه‌ها و استانداردها	استفاده از نمونه‌های قدیمی یا نامناسب	ترجیحاً از نمونه‌های تازه استفاده کنید
	دمای نامناسب ترکیبات	اجازه دهید تمام ترکیبات به دمای اتاق رسید، 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	محلول کار را قبل از استفاده آماده کنید
	زمان و درجه حرارت نامناسب انکوباسیون	به پروتکل مراجعه کرده و زمان و دمای مناسب انکوباسیون را بررسی نمایید
نتایج غیر منتظره	استفاده از حجم‌های نامناسب	از سمپلر کالیبره شده استفاده نمایید
	نمونه‌ها در طول موج نادرست خوانده شوند	تنظیمات فیلتر و دستگاه را بررسی نمایید
	نمونه‌ها دارای محتویات مداخله‌گر باشند	در صورت امکان نمونه را بیشتر رقیق نمایید
	خواندن نمونه در بالا و یا زیر محدوده خطی	نمونه‌های غلیظ یا رقیق کرده تا خوانایی آن‌ها در محدوده خطی قرار گیرد

- 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، لطفاً آن را از طریق ایمیل hi@navandsalamat.com با ما در میان بگذارید.