



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 وسیله مهر انقباض عضله صاف عروق، تجمع پلاکتی و چسبندگی لکوسیت‌ها به اندوتلیوم در هومنوستاز 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 توليد شده توسط اکسیداسيون 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 هموژنه و لیزلولی را فراهم می‌کند. در این روش مقدار نیتریک اکساید به طور غیرمستقیم سنجیده می‌شود بدین صورت که اسیدسولفانیلیک 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	۴۸ تست	۹۶ تست	۱۹۲ تست
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 هموژن 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، 2×10^6 سلول را پس از حذف محیط کشت آن به وسیله سانتریفیوژ، در $200 \mu\text{L}$ میکرولیتر PBS (pH=7.4) هموژن 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:

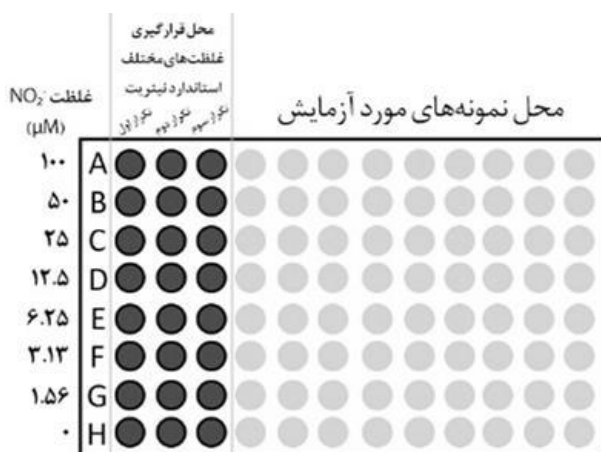
- محلول استاندارد موجود در کیت را به نسبت ۱ به ۱۰ رقیق کنید که محلول رقیق شده، غلظت $100 \mu\text{M}$ میکرومولار استاندارد را خواهد داشت.
- محتویات درون کیت (به جز استاندارد) آماده مصرف می‌باشند.

۳) روش کار:

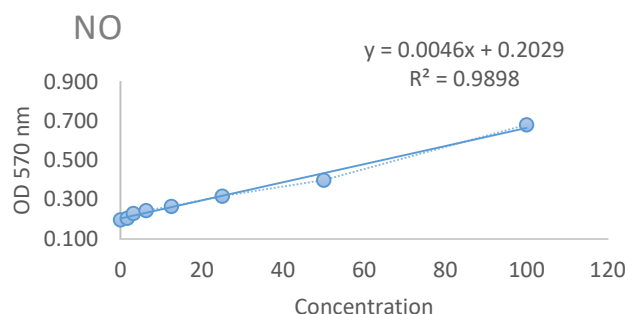
- برای شروع آزمایش، تمام محلول‌های کیت را به منظور رسیدن به تعادل دمایی به مدت ۱۵ تا ۳۰ دقیقه در دمای اتاق قرار دهید.
- در ابتدا برای افزایش دقت و حذف مداخله‌گرهای آزمایش باید پروتئین نمونه‌های سرم، پلاسما، خون کامل، بافت و سلول‌ها رسوب داده شود. بدین منظور $150 \mu\text{L}$ میکرولیتر از نمونه را با $80 \mu\text{L}$ میکرولیتر از بافر A (Buffer A) موجود در کیت، درون یک میکروتیوب 1.5 mL میلی‌لیتری مخلوط کرده و پس از ورنکس کامل، $80 \mu\text{L}$ میکرولیتر از بافر B را اضافه و ورنکس 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 $100 \mu\text{M}$ میکرومول قرار گرفتند مابقی نمونه‌ها را نیز به همان روش انجام دهید، در غیر اینصورت به نسبت افزایش بیش از $100 \mu\text{M}$ میکرومول در نمونه‌ها می‌توانید آن‌ها را رقیق نموده و در آخر ضریب رقت را در نتایج اعمال نمایید. برای مثال اگر میانگین نمونه‌ها $150 \mu\text{M}$ میکرومول باشد پیشنهاد می‌شود نمونه‌ها دو برابر رقیق شوند.
- سه ستون (۲۴ چاهک) از میکروپلیت ۹۶ چاهکی را برای منحنی مرجع استاندارد نیتريت تعیین کنید (دایره‌های تیره در شکل). $50 \mu\text{L}$ میکرولیتر آب دوبارتقطیر را به چاهک‌های ردیف B-H اضافه کنید. $100 \mu\text{L}$ میکرولیتر از محلول استاندارد $100 \mu\text{M}$ میکرومولار آماده شده را به ۳ چاهک باقی‌مانده در ردیف A اضافه کرده و در ادامه $50 \mu\text{L}$ 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 100 ، 50 ، 25 ، 12.5 ، 6.25 ، 3.125 و $1.56 \mu\text{M}$ میکرومولار را داشته باشید. در پایان این مرحله چاهک‌های ردیف H فقط حاوی آب دیونیزه خواهند بود.
- برای اندازه‌گیری NO در نمونه‌ها به میزان $50 \mu\text{L}$ میکرولیتر از هر نمونه را در چاهک‌های رنگ روشن مطابق شکل بریزید.
- از معرف R1 به میزان $50 \mu\text{L}$ 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.
- بعد از انکوباسیون، معرف R2 را به میزان $50 \mu\text{L}$ میکرولیتر به هر چاهک (تیره و روشن) اضافه نموده و مخلوط نمائید. (نوند سلامت به منظور مخلوط کردن، انجام Pipetting را توصیه می‌کند).
- ۱۰ دقیقه پس از مخلوط کردن معرف‌ها، پلیت را در طول موج 570 nm نانومتر در مقابل بلانک ($50 \mu\text{L}$ R1 + $50 \mu\text{L}$ R2 + $50 \mu\text{L}$ DW) قرارت نمائید. حداکثر مدت زمان پایدار بودن رنگ محلول‌ها ۳۰ دقیقه است.

توجه: حجم نهایی در هر چاهک $150 \mu\text{L}$ میکرولیتر بوده و برای سنجش محدوده غلظت نیتريت ۰ تا $100 \mu\text{M}$ 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 می‌باشد)

x: غلظت استاندارد (μM)

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

واحد سنجش نیتریک اکساید: μM

۵) توصیه‌ها:

- 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.
- 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 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 معرف‌ها، مواد و دستگاه‌ها در زمان مناسب آماده می‌شوند.
- در زمان کار با کیت رعایت اصول ایمنی آزمایشگاهی الزامی می‌باشد.

۶) عیب‌یابی:

مشکل	احتمالات موجود	راه حل‌های پیشنهادی
عدم کارکرد سنجش یا آزمایش	عدم رعایت ترتیب مراحل آزمایش پلیت ریدر در طول موج نادرست سرد بودن بافر آزمایش	به پروتکل موجود مراجعه کرده و دقیقاً پیروی نمایید تنظیمات فیلتر دستگاه را چک نمایید دمای بافر باید به دمای اتاق رسیده باشد
نمونه‌ها با قرانت (خوانش) نامنظم یا نامعقول	نمونه‌ها در بافرهای متفاوتی تهیه شده باشند استفاده از نمونه‌های چند بار دفریز شده نمونه‌های کشت بافت/سلول به صورت کامل هموژن نشده باشند استفاده از نمونه‌های قدیمی یا نامناسب	از بافر موجود در کیت استفاده نموده و یا به دستورالعمل موجود در پروتکل مراجعه نمایید اگر نمونه‌ها چندین بار مورد استفاده قرار خواهند گرفت آن‌ها را به دو یا سه قسمت تقسیم نمایید هموژن کردن نمونه را تکرار نمایید. مدت زمان مرحله‌ی همگن سازی را افزایش دهید از نمونه‌های تازه استفاده کرده و تا زمان استفاده به درستی نگهداری شود
خوانش بالا / پایین در نمونه‌ها و استانداردها	دمای نا مناسب ترکیبات استفاده از کیت منقضی شده و یا نگهداری نامناسب معرف‌ها استفاده از حجم‌های نامناسب	اجازه دهید تمام ترکیبات به دمای اتاق رسیده، سپس به آرامی ترکیب نمایید تاریخ انقضای کیت را چک نموده و معرف‌ها را در شرایط مناسب نگهداری نمایید از سمپار کالبره شده استفاده نموده و مواد را تقسیم نمایید
منحنی استاندارد غیر خطی	استفاده از ترکیبات نیمه گرم شده خطاهای مرتبط با پیمایش کردن در آماده سازی محلول‌های استاندارد خطاهای پیمایش کردن در محلول واکنش تشکیل حباب های هوا در چاهک‌ها غلظت محلول استاندارد نادرست است خطاهای محاسبات	قبل از آماده سازی محلول واکنش، همه اجزاء را به دمای مناسب رسانده سپس دوباره ترکیب نمایید از حجم های بالا استفاده نمایید محلول کار را هر زمان که ممکن است حاضر نمایید محتویات پیمایش را به آرامی در چاهک ها خالی نمایید به دستورالعمل استاندارد رقت در پروتکل مراجعه کنید بعد مراجعه به پروتکل ، محاسبات را دوباره انجام دهید
نتایج غیر منتظره	نمونه‌ها در طول موج نادرست خوانده شوند نمونه ها دارای محتویات مداخله گر باشند خواندن نمونه در بالا / زیر محدوده خطی	تنظیمات فیلتر و دستگاه را بررسی نمایید در صورت امکان نمونه را بیشتر رقیق نمایید 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، لطفاً آن را از طریق ایمیل hi@navandsalamat.com با ما در میان بگذارید.

