KIAZIST

Life Sciences

کیت اندازه گیری گونه های آزاد اکسیژن به روش فلوسایتومتری و فلوریمتری

ROS Assay Kit

KROS96

اصول کار

گونه های آزاد اکسیژن (ROS) شامل مواد واکنشگر شیمیایی می باشند که حاوی اکسیژن هستند. آنها به طور طبیعی در میتوکندری سلول (ROS داخلی) یا در اثر مواد گوناگون خارجی (ROS خارجی) در سلول ایجاد می شوند. وجود آنها به عنوان بخشی از رادیکال های آزاد می تواند همراه با آسیب های گوناگون به انواع ماکرومولکول های سلول همراه باشد که به نوبه خود منجر به اختلال، ایجاد آسیب بافتی و یا سلولی می گردد. در بسیاری از موارد این اختلالات منجر به آسیب های جدی مانند سرطان می شوند.

از جمله گونه های آزاد اکسیژن می توان به رادیکال سوپراکسید، رادیکال هیدروکسیل، پراکسیدها و اکسیژن تکی اشاره کرد.

در این آزمایش از ماده ی DCFDA یا DCHF برای شناسایی این گونه های واکنشگر استفاده می شود. این ماده به سلول های زنده نفوذ کرده و سپس توسط آنزیم های استراز داخل سلولی داستر (de-esterified) می شود و درون سلول به دام می افتد. در ادامه پس از احیا شدن توسط گونه های آزاد اکسیژن از خود خاصیت فلورسانس نشان می دهد.

این فلوروفور در طول موج Ex/Em=485/525 نانومتر در فلوریمتری با پلیت و یا فلوسایتومتری قابلیت خوانش دارد.

اطلاعات کلی و محتویات

نگهداری و حمل:

در دمای C° 20- نگهداری شود. حمل توسط یخ مرطوب انجام می شود.

مقدار نمونه پیشنهادی

نمونه	حداکثر	مطلوب
Cells	1.5×10^6	5×10^5 –1×10^6

محتویات کیت

شماره	ماده	مقدار/تعداد
۱	ROS Buffer	50 mL
۲	DCFDA Reagent	40 uL
۳	H2O2 (9.79 M)	50 uL
۴	DCFDA Oxidized	20 uL
۵	96-well Sterile Fluorimetric Plate For Culturing	در صورت درخواست
۶	Protocol Booklet	1 PCs

موارد مورد نیاز اضافی

- ست سمپلر متغیر
- سرسمپلر مناسب
- مواد کشت سلولی (محیط کشت، FBS و ...)
- میکروتیوب ۱/۵ میلی لیتری
- سانتریفیوژ دور بالا (12000 RPM)
- دستگاه Fluorimetric Plate Reader با طول موج Ex/Em=485/525 نانومتر یا دستگاه فلوسایتومتری با لیزر آبی
- مواد مداخله یا آزمایش مورد نظر
- ماده ی آنتی اکسیدان مانند محلول ویتامین C و یا .... برای تست کنترل منفی

نکته: قبل از شروع، آزمایش با یک نمونه جهت مشخص ساختن مقدار نمونه به صورت پایلت (Pilot) به همراه یک استاندارد انجام شود.

***قبل از انجام تست کل پروتکل را بخوانید.**

آماده سازی کیت

- **پس از آماده سازی نمونه موارد زیر را آماده کنید.**
- **ROS Buffer: آماده مصرف.**
- **Supplement buffer: ۱۸ میلی لیتر از ROS Buffer را با ۲ میلی لیتر FBS ترکیب نمایید.**
- **H2O2 Positive control: یک میکرولیتر از H2O2 را به ۱۰ میلی لیتر Supplement buffer اضافه کنید. این محلول در دمای اتاق تا ۲ ساعت پایدار است. این محلول به عنوان کنترل مثبت و القا کننده ROS استفاده می شود.**
- **محلول کاری DCFDA Reagent: ۱۰ میکرولیتر از محلول DCFDA Reagent را با ۱۰ میلی لیتر از محلول ROS Buffer ترکیب کنید. این محلول تا ۵ ساعت در دمای ٤ درجه سانتی گراد و بدور از نور پایداری دارد. غلظت نهایی این ماده 20 µM می باشد. برای هر رده از سلول متفاوت می باشد و توسط کاربر باید تعیین شود. بازه قابل قبول 10-50 µM می باشد.**
- **محلول کاری DCFDA Oxidized: این محلول فرم اکسید شده DCFDA می باشد و پس از وارد شدن به سلول سیگنال می دهد. از این محلول برای تایید انجام تست استفاده می شود تا از کارکرد دستگاه و زنده بودن سلول ها اطمینان حاصل شود. یک میکرولیتر از محلول DCFDA Oxidized را با یک میلی لیتر از محلول ROS Buffer ترکیب کنید. این محلول تا ۵ ساعت در دمای ٤ درجه سانتی گراد و بدور از نور پایداری دارد.**

نحوه انجام آزمایش

- تمامی مواد را قبل از آزمایش آماده نمایید.
- تمامی آزمایش ها برای جلوگیری از خطای تصادفی باید به صورت دوتایی انجام شود.
- فقط از سلول های زنده استفاده شود و نه سلول های فیکس شده.
- به عنوان بلانک دو چاهک که فقط بافر Supplement buffer و ماده مداخله هستند و سلول ندارند استفاده شود.
-

روش میکروپلیت-فلوریمتری برای سلول چسبنده

۱. سلول ها را در پلیت تیره به میزان ۲۵ هزار سلول در هر چاهک کشت دهید تا به درجه اشباع مورد نظرتان برسند (۸۰ تا ۹۰٪).
۲. سپس سلول ها را با ROS Buffer شستشو دهید و سوپرناتانت را دور بریزید.
۳. پس از آن، از محلول کاری DCFDA Reagent به میزان 100 µL/well اضافه کرده و در دمای 37 °C به مدت ۴۵ دقیقه در تاریکی انکوبه کنید.

نکته: برای تایید تکنیک 100 uL از محلول کاری DCFDA Oxidized را به دو چاهک اضافه کنید. میزان فلورسانس این دو چاهک بالا خواهد بود.

۴. در ادامه محلول را خارج کرده و به هر چاهک ROS Buffer اضافه کنید و میزان فلورسانس را بلافاصله به صورت EX/EM=485/535 nm اندازه گیری کنید.

۵. در ادامه برای بررسی ماده مورد نظر خود و یا مداخله مورد نظر، محیط را از هر چاهک خارج کرده ماده مورد نظر خود را در محیط کشت مورد نظر (همراه با 10% FBS) و یا Supplement buffer رقیق کرده و به میزان 200 µL/well به هر چاهک اضافه کنید و به مدت ۱ تا ۶ ساعت در دمای 37 °C انکوبه کنید.

نکته: در این مرحله می توانید از H2O2 Positive control به دو چاهک به عنوان کنترل مثبت ROS اضافه کنید. ضمن اینکه می توان دو چاهک دیگر حاوی H2O2 Positive control را به همراه آنتی اکسیدان مورد نظر به عنوان کنترل منفی بکار برد.

۶. پس از گذشت این زمان بدون شستشو، فلورسانس را به صورت EX/EM=485/535 nm اندازه گیری کنید.

روش فلوسایتومتری و پلیت برای سلول چسبنده

۱. ابتدا سلول های خود را کشت دهید و در ظروف مورد نظر بکارید. دقت داشته باشد گروه کنترل که درمان شما را دریافت نمی کند حتما وجود داشته باشد. کنترل شما می تواند حاوی محیط کشت شما و یا حلال داروی شما باشد.

۲. در ادامه سلول ها را برداشت کرده و پس از شستشو با ROS Buffer ، به میزان ۱۵۰ هزار سلول برای هر گروه و به صورت دوتایی (Duplicate) در میکروتیوب قرار دهید.

۳. محلول ها را پس از سانتریفیوژ دور ریخته، پس از آن، از محلول کاری DCFDA Reagent به میزان 100 µl اضافه کرده و در دمای 37 °C به مدت ۴۵ دقیقه در تاریکی انکوبه کنید.

نکته: برای تایید تکنیک uL 100 از محلول کاری DCFDA Oxidized را به دو تیوب اضافه کنید. میزان فلورسانس این دو تیوب بالا خواهد بود.

۴. پس از این زمان بدون شستشو، ماده مورد نظر خود برای مداخله را در محیط کشت مورد نظر خود (همراه با 10% FBS) و یا Supplement buffer رقیق کرده و به میزان µl 200 به هر تیوب اضافه کنید و به مدت ۱ تا ۶ ساعت در دمای °C 37 انکوبه کنید.

نکته: در این مرحله می توانید از H2O2 Positive control به دو تیوب به عنوان کنترل مثبت ROS اضافه کنید. ضمن اینکه می توان دو تیوب دیگر حاوی H2O2 Positive control را به همراه آنتی اکسیدان مورد نظر به عنوان کنترل منفی بکار برد.

برای روش پلیت سلول های معلق در این مرحله سلول ها را از تیوب به چاهک های پلیت تاریک منتقل کنید و لورسانس را به صورت EX/EM=485/535 nm اندازه گیری کنید.

۵. برای فلوسایتومتری، ابتدا gating را انجام داده و دبریدها را از سلول ها جدا کنید. سپس سیگنال را FL1 یا BL1 بخوانید. هیستوگرام گروه کنترل به عنوان پایه برای gating بکار می رود.

۶. شمارش ۱۰۰۰۰ سلول برای آنالیز در هر تیوب کافیست.

محاسبه روش پلیت:

۱. **ابتدا از چاهک های دوتایی میانگین بگیرید.**

۲. **میانگین جذب چاهک های بلانک را از نمونه ها کم کنید.**

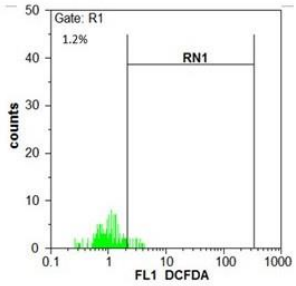
۳. **سپس میزان افزایش گونه های آزاد اکسیژن را نسبت به گروه کنترل خود به صورت برابر گزارش دهید. (گروه کنترل را عدد یک در نظر بگیرید و بقیه گروه ها نسبت به کنترل n برابر می شوند).**

محاسبه روش فلوسایتومتری:

۱. **بعد از انجام gating و حذف دبرید ها در نمودار forward-side scatter، هیستوگرام را در کانال FL1 یا BL1 رسم کنید.**

۲. **سپس gating را مجددا بر روی گروه کنترل به عنوان پایه (Base) انجام دهید.**

۳. **بقیه گروه ها نسبت به گروه کنترل دارای افزایش میزان ROS هستند که به درصد قابل نشان دادن می باشد.**

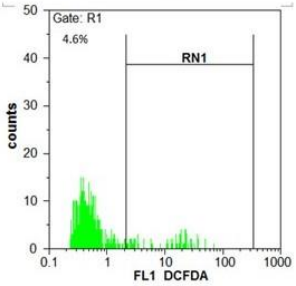


Control

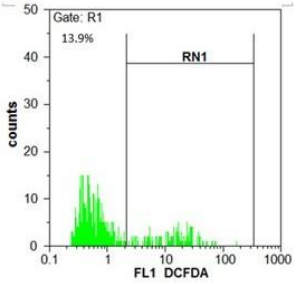
سلول های بنیادی انسانی

در معرض غلظت های مختلف

هیروژن پراکسید پس از ۲ ساعت



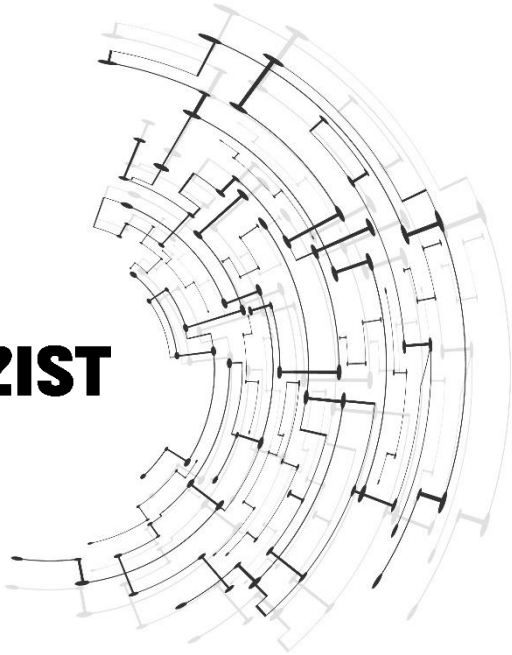
10 μM H_2O_2



50 μM H_2O_2

در صورتیکه میخواهید ۲۴ تا ۴۸ بعد اثر ماده مداخله خود را بر میزان ROS ببینید به صورت زیر عمل کنید:

۱. سلول ها را در مقدار مورد نظر کاشته و مداخله خود را پس از رسیدن به درجه اشباع مورد نظر آغاز کنید. پس از این زمان سلول را با بافر ROS Buffer دو بار شستشو دهید و سانتریفیوژ کنید.
۲. سپس به هر چاهک یا تیوب 100 µL از محلول کاری DCFDA Reagent اضافه کرده و در دمای 37 °C به مدت ۴۵ دقیقه در تاریکی انکوبه کنید.
۳. میزان فلورسانس را بلافاصله به صورت EX/EM=485/535 nm اندازه گیری کنید و یا با دستگاه فلوسایتومتری آنالیز کنید.



KIAZIST

www.Kiazist.com

081-3450 8267
0930 402 4884

Info@Kiazist.com