KIAZIST

Life Sciences

کیت اندازه گیری فعالیت آنزیم سوپراکسید دیسموتاز

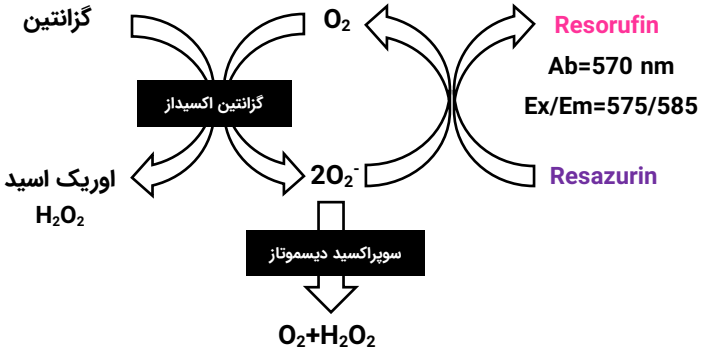
به روش کالریمتریک و فلوریمتریک

SOD Activity Kit

KSOD96

اصول کار

سوپراکسید دیسموتاز (Superoxide Dismutase) یکی از آنزیم های آنتی اکسیدانی می باشد که با خنثی کردن یون سوپراکسید (O_2^-) در جلوگیری از استرس اکسیداتیو موثر است. این آنزیم در یوکاریوت ها دارای دو فرم سیتوپلاسمی و میتوکندریایی می باشد که در این کیت هر دو بطور همزمان اندازه گیری می شوند. این کیت قادر است به هر دو روش کالریمتریک و فلوریمتریک و با حساسیت بسیار بالا فعالیت آنزیم SOD را اندازه گیری کند.



نگهداری و حمل:

در دمای 4°C نگهداری شود. حمل توسط یخ مرطوب انجام می شود.

مقدار نمونه پیشنهادی

نمونه	حداکثر	مطلوب
Tissues from animal/plant	30 mg	20 mg
Cells	3×10^6	5×10^5 –1×10^6
Serum	40 µl	20 µl

محتویات کیت

شماره	ماده	مقدار/تعداد
1	SOD Buffer 10X	5 mL
2	SOD Substrate	100 µL
3	Dilution Buffer 10X	1.5 mL
4	XO Enzyme Mix	160 µL
5	96-well Clean photometric Plate	2 PCs

موارد مورد نیاز اضافی

- ست سمپلر متغیر و چند کاناله
- سرسمپلر مناسب
- میکروتیوب ۱/۵ میلی لیتری
- سانتریفیوژ دور بالا (12000 RPM)
- دستگاه Plate Reader با طول موج 570-520 نانومتر یا دستگاه فلورسانس با مشخصات Ex/Em=537/586
- بافر PBS یا بافر استخراج آنزیم کیازیست (KPEX50)
- مهار کننده پروتئازها (پیشنهادی کیازیست KPI100)

نکته: توصیه اکید می شود قبل از شروع، ابتدا جهت مشخص ساختن میزان آنزیم در نمونه های مورد بررسی، آزمایش توسط تعدادی از نمونه ها به صورت پایلت (Pilot) همراه با رسم استاندارد انجام شود.

-در راستای این موضوع جهت حذف تداخلات نمونه، رقت های 1:5، 1:10، 1:20 و 1:40 از یک نمونه آماده شود و تست انجام شود. سپس رقتی که بیشترین فعالیت را دارا بود جهت انجام نمونه ها انتخاب شود.

**قبل از انجام تست کلیه مطالب مندرج دفترچه را تا انتها و با دقت مطالعه کنید.

هموژن کردن بافت

نمونه بافت: ۱۰ تا ۲۰ میلی گرم از بافت را توسط سونیکاتور و یا هموژنایزر در بافر PBS (یا بافر جایگزین) که حاوی کوکتل مهارکننده پروتئاز می باشد لیز کرده و سپس در 12000 rpm به مدت ۱۵ دقیقه در ۴ درجه سانتریفیوژ کنید . سوپرناتانت را در تیوب جدید در دمای 80-°C فریز کنید.

سلول های چسبنده

محیط را خالی و سپس سلول ها را تریپسینه کرده و پس از سانتریفیوژ کردن سوپرناتانت را دور ریخته و در بافر PBS (یا بافر جایگزین) که حاوی کوکتل مهارکننده پروتئاز می باشد تا ۳ بار فریز و دفریز نمایید تا سلول ها لیز شوند. سپس در 12000 rpm به مدت ۱۵ دقیقه در ۴ درجه سانتریفیوژ کنید . سوپرناتانت را در تیوب جدید در دمای 80-°C فریز کنید.

سلول های معلق

پس از سانتریفیوژ کردن سوپرناتانت را دور ریخته و در بافر PBS (یا بافر جایگزین) که حاوی کوکتل مهارکننده پروتئاز می باشد تا ۳ بار فریز و دفریز کرده تا سلول ها لیز شوند. سپس در 12000 rpm به مدت ۱۵ دقیقه در ۴ درجه سانتریفیوژ کنید . سوپرناتانت را در تیوب جدید در دمای 80-°C فریز کنید.

نمونه پلاسما

خون را در تیوب حاوی ضد انعقاد ریخته و به مدت ۱۰ دقیقه در 1000×g سانتریفیوژ کنید . پلاسمای زرد رنگ را بدون آسپیره کردن لایه سفید بافی (لکوسیت) برداشته و تا زمان آزمایش در دمای 80-°C فریز کنید. نمونه های سرم یا پلاسما به صورت 1:10 الی 1:40 بسته به میزان فعالیت با 1x Dilution Buffer رقیق شوند.

پس از آماده سازی نمونه موارد زیر را آماده کنید.

همه محلول ها ابتدا می بایست در دمای اتاق گرم شوند.

۲ میلی لیتر از SOD Buffer 10X را با ۱۸ میلی لیتر آب دیونیزه مخلوط کنید تا SOD Buffer 1X حاصل شود.

SOD Assay Reagent:

برای روش کالریمتری: ۱۰۰ میکرولیتر از SOD Substrate را در یک تیوب جدید توسط SOD Buffer 1X به حجم ۲۰ میلی لیتر برسانید.

برای روش فلوریمتری: ۱۰ میکرولیتر از SOD Substrate را در یک تیوب جدید توسط SOD Buffer 1X به حجم ۲۰ میلی لیتر برسانید.

سپس آنرا تقسیم کرده (Aliquot) و برای مصارف بعدی در دمای -20°C ذخیره کنید. محلول رقیق شده در دمای 4°C حداکثر به مدت ۲ هفته پایدار است.

Dilution Buffer 10x را با ۱۳/۵ میلی لیتر آب دیونیزه رقیق کرده تا به صورت Dilution Buffer 1x درآید. محلول رقیق شده در دمای 4°C به مدت ۳ ماه پایدار است.

XO Working Solution: به XO Enzyme Mix مقدار 840 µL از Dilution Buffer 1x را اضافه نمایید. این محلول تا یک ساعت پس از آماده سازی در دمای اتاق و بر روی یخ پایدار است. هر نمونه و یا بلانک ۱ µL 10 از این محلول نیاز دارد. باقیمانده را جهت مصارف بعدی تا ۳ ماه فریز کنید.

بر طبق جدول زیر در هر چاهک آماده شود:

ماده	نمونه (µL)	کنترل نمونه (µL)	بلانک ۱ (µL)	بلانک ۲ (µL)
نمونه مورد آزمایش	۲۰	۲۰	۰	۰
SOD Assay Reagent	۱۰۰	۱۰۰	۱۰۰	۱۰۰
Dilution Buffer 1X	۰	۱۰	۰	۱۰
آب دیونیزه	۰	۰	۲۰	۲۰
XO Working Solution	۱۰	۰	۱۰	۰

نکته ۱: XO Working Solution به عنوان آخرین ماده اضافه شود و برای این کار از سمپلر چند کاناله استفاده کنید زیرا واکنش آنزیمی با اضافه کردن آن آغاز می شود. این محلول فقط به نمونه و بلانک ۱ اضافه می شود.

نکته ۲: چاهک بلانک ۱ و بلانک ۲ در کل دو عدد می باشند (هر کدام به صورت دوتایی) و نیازی به تکرار برای هر نمونه بصورت مجزا نمی باشد.

نکته ۳: چاهک کنترل نمونه، برای هر نمونه و به موازات چاهک آن نمونه مورد نیاز است.

نحوه انجام آزمایش

۱. پس از اضافه کردن XO Working Solution پلیت را به آرامی تکان داده تا مواد داخل چاهک ها باهم مخلوط شوند.

۲. سپس به مدت ۲۰ دقیقه در دمای ۳۷ درجه سانتیگراد انکوبه کنید.

۳. در انتها جذب را در طول موج ۵۲۰-۵۷۰ (پیشنهادی ۵۷۰) نانومتر بخوانید.

۴. برای روش فلورومتری با مشخصات Ex/Em=572/586 خوانده شود. پهنای باند را برای افزایش حساسیت روی 5 nm تنظیم کنید.

نکته : به عنوان کنترل مثبت می توان RBC لیز شده را به میزان 1:100 رقیق کرد و در آزمایش بکار برد. RBC حاوی مقادیر بالایی از SOD می باشد.

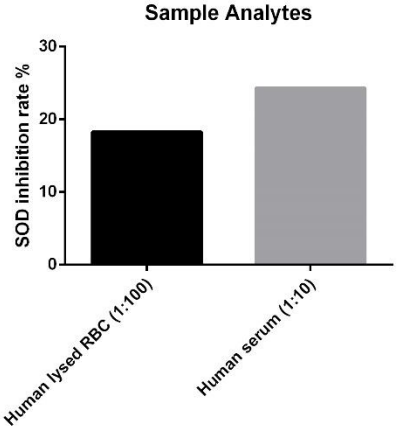
- فعالیت بر اساس درصد مهار (Inhibition Rate %) بیان می شود.

-برای هر نمونه جداگانه محاسبه شود. دقت داشته باشید که بلانک ۱ و بلانک ۲ برای تمامی نمونه ها یک عدد می باشد.

$$\text{Inhibition Rate} = \frac{(\text{جذب کنترل نمونه} - \text{جذب نمونه}) - (\text{جذب بلانک 2} - \text{جذب بلانک 1})}{(\text{جذب بلانک 2} - \text{جذب بلانک 1})} \times 100$$

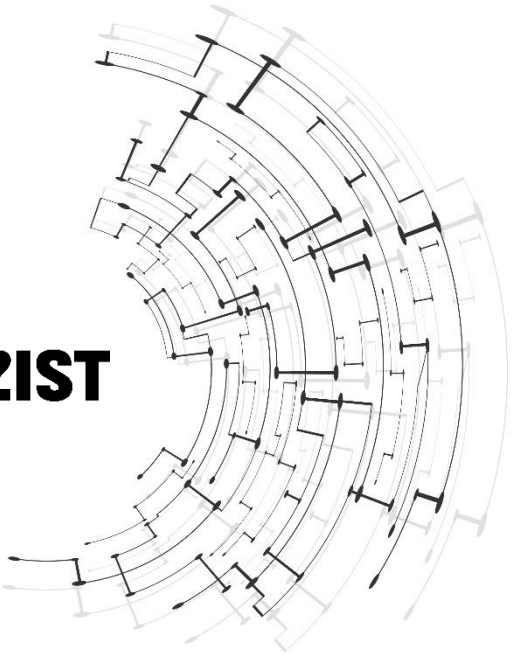
1U SOD Activity=Inhibition Rate of 50%

- بعد از تبدیل به واحد ضریب رقت نمونه را اعمال کنید.
- جهت افزایش صحت نتایج، می توان غلظت پروتئین هر نمونه را اندازه گیری کرد و نرمال سازی مقادیر را بر اساس واحد U/mg of Protein گزارش کرد.


Sample Analytes
SOD inhibition rate %
30
20
10
0
Human lysed RBC (1:100)
Human serum (1:10)

مشکل یابی

مشکل	علت	راه حل
عدم کارکرد تست	سرد بودن بافرها و مواد	همه مواد را به دمای اتاق برسانید
	طول موج اشتباهی	سعی کنید طول موج 570nm را انتخاب کنید
نمونه با خوانش غیر عادی	عدم هموژن شدن کامل نمونه	از هموژنازیر یا سونیکاتور استفاده کنید
	نمونه چند بار فریز-دفریز شده است	اگر نیاز به چندین بار استفاده از نمونه دارید قبل از فریز کردن آن را تقسیم بندی کنید.
	نمونه های کهنه استفاده شده است	نمونه های با ذخیره بلند مدت حتما در نیتروژن ذخیره شود
	وجود عوامل مداخله گر مانند چربی و یا بافر استخراج نامناسب	عوامل مداخله گر حذف شوند و بافر مناسب استخراج استفاده شود
جذب خیلی بالای نمونه	نمونه حاوی تداخل گر های زیادی می باشد	نمونه را در Dilution Buffer 1X رقیق کنید
جذب خیلی پایین نمونه	نمونه با فعالیت بسیار بالای آنزیم	مقدار بافت اولیه را کاهش داده و از بافر استخراج مناسب استفاده کنید



KIAZIST

www.Kiazist.com

081-3450 8267
0930 402 4884

Info@Kiazist.com