KIAZIST Life Sciences

کیت اندازه گیری نیتریک اکساید

Nitric Oxide Assay Kit

KNO96

جهت سنجش ۹۶ نمونه

اصول کار

نیتریک اکساید (NO) در واقع یک ناقل پیام رسانی سلولی در مهره داران ، گیاهان، باکتری و قارچ ها می باشد. این ناقل التهابی، می تواند توسط فاگوسیت ها در مهره داران تولید شود و مسیرهای التهابی پایین دست را فعال کند. اثر گشادکنندگی عروقی آن بخوبی شناخته شده است. همچنین این ماده به عنوان رادیکال آزاد شناخته شده است که منجر به افزایش استرس اکسیداتیو نیز می شود.

در این آزمایش از معرف Griess به عنوان واکنش دهنده با نیتریک اکساید استفاده می شود. سپس نیتریک اکساید با معرف باند شده و در طول موج ۵۴۰-۵۶۰ نانومتر قابل خوانش می باشد.

این کیت با اعمال روش های نوین منجر به افزایش حساسیت روش اندازه گیری شده است.

اطلاعات کلی و محتویات

نگهداری و حمل:

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

محدوده اندازه گیری دینامیک: 3.12-50 nmol/mL

حساسیت: 1 nmol/mL

مقدار نمونه پیشنهادی

نمونه	حداکثر	مطلوب
Tissues from animal/plant	80 mg	30 mg
Cells	1.5×10^{6}	5×10^{5} –1×10^{6}
Serum	100 µl	80 µl

محتویات کیت

شماره	ماده	مقدار/تعداد
1	NO Reagent A	**2 vials**
2	NO Reagent B	**5 mL**
3	NO Reagent C	**5 mL**
4	Nitrate Standard	**Powder**
5	Deproteinizer 1	**4 mL**
6	Deproteinizer 2	**4 mL**
7	NO Assay Buffer	**50 mL**
8	96-well Clean photometric Plate	**1 PCs**

موارد مورد نیاز اضافی

- ست سمپلر متغیر و چند کاناله
- سرسمپلر مناسب
- میکروتیوب ۱/۵ میلی لیتری
- سانتریفیوژ دور بالا (12000 RPM)
- فور با دمای ۴۰ درجه سانتی گراد
- آب دیونیزه
- HCl غلیظ
- دستگاه Plate Reader با طول موج ۵۴۰-۵۶۰ نانومتر

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 نمونه

هموژن کردن بافت

نمونه بافت: ۱۰ تا ۲۰ میلی گرم از بافت را توسط سونیکاتور و یا هموژنایزر در **NO Buffer** هموژن 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 **NO Buffer** تا ۳ بار فریز و دفریز نمایید تا سلول ها لیز شوند.

سلول های معلق

پس از سانتریفیوژ کردن سوپرناتانت را دور ریخته و در **NO Buffer** تا ۳ بار فریز و دفریز کرده تا سلول ها لیز شوند. توجه**: برخی محیط هایی مانند **RPMI** حاوی نیترات بالا می باشند که با این آزمایش داخل دارد. لطفا پلت سلولی حاصل را چندین بار با **PBS** شستشو دهید تا نیترات آن کاملا شسته شود یا ترجیحا محیط را تغییر دهید..

نمونه سرم

خون را در تیوب بدون ضد انعقاد ریخته و به مدت ۳۰ دقیقه در دمای اتاق گذاشته تا لخته شود.سپس در **2500×g** به مدت ۲۰ دقیقه سانتریفیوژ کنید . سرم زرد رنگ را بدون آسپیره کردن لایه سفید بافی (لکوسیت) برداشته و تا زمان آزمایش در دمای ۸۰- فریز کنید. **نکته: از نمونه همولیز پرهیز شود. نمونه **EDTA** ارجح تر می باشد.

نمونه گیاه

ابتدا گیاه را سونیکیت و یا خرد کرده و به مدت ۱۰ دقیقه در **NO Buffer** نگه دارید. سپس در **2500×g** به مدت ۲۰ دقیقه سانتریفیوژ کنید. سوپرناتانت را جمع آوری کنید.

نمونه خاک یا خوراکی

نمونه را خرد کرده و در **NO Buffer** به مدت ۱۰ دقیقه در دمای اتاق انکوبه کنید. سپس در **2500×g** به مدت ۲۰ دقیقه سانتریفیوژ کنید. سوپرناتانت را جمع آوری کنید.

آماده سازی کیت و استاندارد

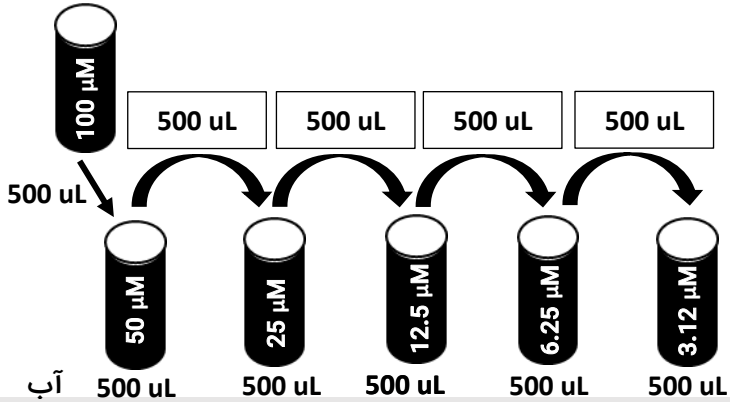
- پس از آماده سازی نمونه موارد زیر را آماده کنید. محلول ها تا یک ساعت پس از آماده سازی پایدار هستند. همه محلولها در دمای اتاق گرم شوند.

-تمام مواد کیت را قبل از شروع اسپین کنید تا محتویات از در و دیواره به ته ظرف جمع آوری شود.

NO Reagent A: 40 µL از HCl غلیظ به هر ویال اضافه کرده و سپس 960 µL آب دیونیزه به آن اضافه کنید. سپس به خوبی هم زده و در دمای اتاق به مدت یک دقیقه انکوبه کنید تا رنگ آبی نفتی حاصل شود. (در تاریکی تا ۲ هفته پایدار می باشد).

آماده سازی استاندارد:

به ویال استاندارد nitrate ۵ میلی لیتر NO Assay Buffer اضافه کرده سپس آن را تقسیم بندی کرده و در دمای 20°C- به مدت ۱۲ ماه نگه دارید. غلظت ویال استاندارد 10 mM Nitrate می باشد. از ویال استاندارد 10 µL را به 990 µL آب دیونیزه اضافه کرده تا استاندارد **100 µM** حاصل شود. سپس به هر میکروتیوب ۵۰۰ میکرولیتر آب دیونیزه اضافه کرده و با توجه به شکل زیر استانداردها را به روش رقت سازی سریالی آماده سازید:



نحوه انجام آزمایش

دپروتئینه کردن نمونه:

۱- از محلول Deproteinizer 1 به میزان ۱ به ۳ به نمونه اضافه کنید و خوب هم بزنید (یک قسمت محلول Deproteinizer 1 با ۳ قسمت نمونه) و به مدت ۵ دقیقه روی یخ انکوبه کنید. سپس نمونه را در 6000×g به مدت ۱۰ دقیقه سانتریفیوژ کنید.

۲- در ادامه به نسبت ۱ به ۲ از سوپرناتانت را برداشته و به آن از محلول Deproteinizer 2 آن اضافه کنید و خوب هم بزنید (یک قسمت محلول Deproteinizer 2 با ۲ قسمت نمونه).

۳- سپس نمونه را در 6000×g به مدت ۱۰ دقیقه سانتریفیوژ کنید، سوپرناتانت را برداشته و برای مرحله بعد می توانید در دمای 80C- ذخیره یا آزمایش را ادامه دهید.

۴- جهت محاسبه غلظت اصلی نمونه به دلیل رقیق شدن با محلول های دپروتئینه، از فرمول زیر اقدام کنید تا عدد K را بدست آورده و در فرمول نهایی محاسبه در قسمت نحوه محاسبه جایگزین کنید:

$$\text{غلظت اصلی (K)} = \frac{A}{A+B+C}$$

A=حجم اولیه نمونه
B=حجم Deproteinizer 1
C=حجم Deproteinizer 2

نحوه انجام آزمایش

نحوه انجام آزمایش:

۱- ابتدا به ازای هر نمونه، استاندارد و یا بلانک مسترمیکس زیر را مخلوط می کنیم.

نام ماده	مقدار به میکرولیتر
NO Reagent A	20
NO Reagent B	50
NO Reagent C	50

۲- در ادامه 100-1 µL از نمونه (مابقی با NO Assay Buffer تا حجم 100 µL جبران شود) را با 120 µL از مسترمیکس آماده شده ترکیب کنید. دقت داشته باشید مقدار نمونه (V) را بدون احتساب بافر NO یادداشت نمایید تا در مرحله محاسبه استفاده شود.

۳- سپس در دمای اتاق ۴ تا 24 ساعت انکوبه کنید. زمان واکنش بستگی به رنگ دهی نمونه ها دارد. چاهک هایی که در آن واکنش رخ می دهد می تواند به رنگ صورتی کمرنگ تا ارغوانی درآید.

نکته: انکوباسیون در دمای ۴۰ درجه سرعت واکنش را دو برابر می کند.

۴- در پایان زمان انکوباسیون می توانید جذب نمونه را در طول موج ۵۴۰ تا ۵۶۰ نانومتر (بیشینه ۵۴۵ نانومتر) بخوانید. طول موج رفرانس نیز در ۶۳۰ نانومتر باید خوانده شود تا از جذب ۵۴۵ نانومتر کم شود.

۱- مقدار میانگین جذب بلانک را از نمونه ها و استاندارد کم کنید.

۲- با استفاده از یک نرم افزار مناسب مانند اکسل و با استفاده از جذب استانداردها منحنی استاندارد را رسم کنید و غلظت نمونه ها را حساب نمایید.

۳- از فرمول زیر ادامه محاسبه را انجام دهید:

$$\text{NO Concentration} = \frac{C}{V} \times D \times ۲۰۰ \times \frac{1}{K}$$

C=غلظت بدست آمده از نمودار استاندارد

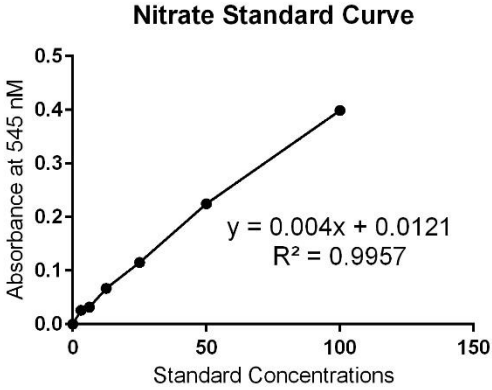
V= حجم ریخته شده از نمونه در هرچاهک بدون احتساب بافر

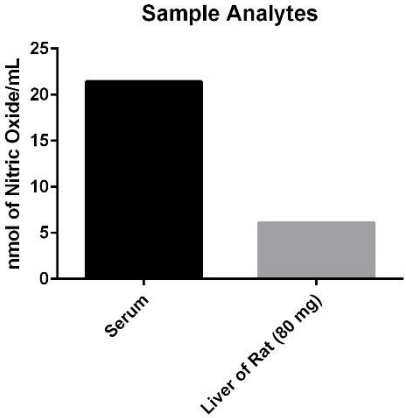
D=ضریب رقت نمونه

K=ضریب رقت اصلی نمونه در مرحله دپروتئینه کردن

۴- نمونه ها بر حسب nmol/mL و یا µM بیان می شوند.

۵- جهت نرمال سازی مقادیر بهتر است میزان پروتئین نمونه ها قبل از آزمایش سنجیده شود و مقادیر برحسب میلی گرم پروتئین نرمال سازی شوند. nmol/mg (Protein)


Nitrate Standard Curve
Absorbance at 545 nM
0.5
0.4
0.3
0.2
0.1
0.0
y = 0.004x + 0.0121
R² = 0.9957
0
50
100
150
Standard Concentrations


Sample Analytes
nmol of Nitric Oxide/mL
25
20
15
10
5
0
Serum
Liver of Rat (80 mg)

مشکل یابی

مشکل	علت	راه حل
جذب بالای منحنی استاندارد	مقدار نمونه اولیه بالا نمونه با پروتئین بالا	مقدار نمونه اولیه را کم کنید رقیق سازی نمونه در PBS Buffer
جذب پایین منحنی استاندارد	-مقدار نمونه اولیه کم -خراب شدن بافر Chromogen	مقدار نمونه را افزایش دهید بافر Chromogen را تازه آماده کنید
کدورت چاهک	غلظت بالای پروتئین نمونه یا سرم	به صفحه حذف اثر پروتئین مراجعه شود
عدم وجود سیگنال	واکنش بیش از حد پیشرفته است مقدار نمونه کم می باشد زمانش واکنش کم می باشد	زمان انکوباسیون را به به بیش از ۳۶ ساعت افزایش دهید مقدار نمونه را افزتیش دهید زمان واکنش را تا ۲۴ ساعت افزایش دهید

KIAZIST

www.Kiazist.com

081-3450 8267
0930 402 4884

Info@Kiazist.com