

کیت اندازه گیری نیتریک اکساید

Nitric Oxide Assay Kit

KN096

جهت سنجش ۹۶ نمونه

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	$5 \times 10^5 - 1 \times 10^6$
Serum	100 μ	80 μ

محتویات کیت

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

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 سانتیفریوژ کنید. سوپرناتانت را در تیوب جدید در دمای **۸۰ °C** فریز کنید.

سلول های چسبنده

محیط را خالی و سپس سلول ها را تریپسینه کرده و پس از سانتیفریوژ 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 سانتیفریوژ 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 **g×2500** به مدت ۲۰ دقیقه سانتیفریوژ کنید. سرم زرد رنگ را بدون آسیبیره 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 **g×2500** به مدت ۲۰ دقیقه سانتیفریوژ 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 **g×2500** به مدت ۲۰ دقیقه سانتیفریوژ کنید. سوپرناتانت را جمع آوری کنید.

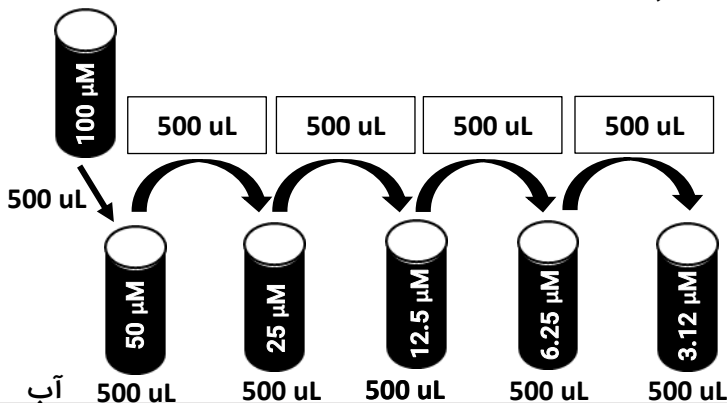
آماده سازی کیت و استاندارد

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

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

۳- سپس نمونه را در $6000 \times g$ 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:

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

A=حجم اولیه نمونه

B=حجم 1 Deproteinizer

C=حجم 2 Deproteinizer

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 $1-100 \mu\text{L}$ از نمونه (مابقی با NO Assay Buffer تا حجم $100 \mu\text{L}$ جبران شود) را با $120 \mu\text{L}$ 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 ۲۴ 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 کم رنگ تا ارغوانی درآید.

نکته: انکوباسیون در دمای 40°C درجه سرعت واکنش را دو برابر می کند.

۴- در پایان زمان انکوباسیون می توانید جذب نمونه را در طول موج 540° تا 560° نانومتر (بیشینه 545° نانومتر) بخوانید. طول موج رفرانس نیز در 630° نانومتر باید خوانده شود تا از جذب 545° نانومتر کم شود.

نحوه محاسبه

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:

$$\text{NO Concentration} = \frac{C}{V} \times D \times 200 \times \frac{1}{K}$$

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 دیپروتئینه کردن

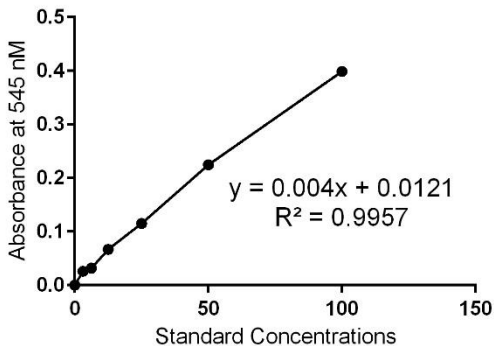
۴- نمونه ها بر حسب nmol/mL و یا μM بیان می شوند.

۵- جهت نرمال سازی مقادیر بهتر است میزان پروتئین نمونه ها قبل از آزمایش

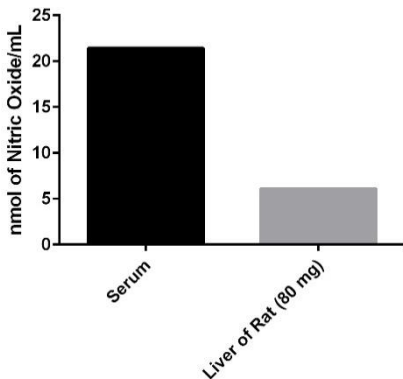
سنجیده شود و مقادیر برحسب میلی گرم پروتئین نرمال سازی شوند. nmol/mg

(Protein)

Nitrate Standard Curve



Sample Analytes



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 زمان واکنش کم می باشد	زمان انکوباسیون را به به بیش از ۳۶ ساعت افزایش دهید مقدار نمونه را افزایش دهید زمان واکنش را تا ۲۴ ساعت افزایش دهید



KIAZIST



www.Kiazist.com



081-3450 8267

0930 402 4884



Info@Kiazist.com

www.kiazist.com