کیت سنجش نیتریک اکساید

Nitric Oxide Assay Kit

(Cat-No: S1184-100 □, S1184-200 □)

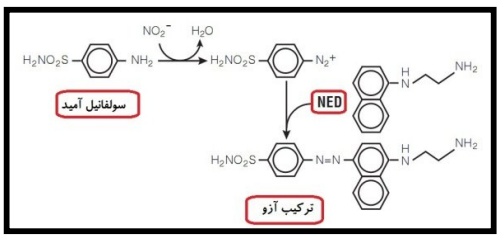
الف) مقدمه

گونه‌های فعال نیتروژن (RNS) و گونه‌های فعال اکسیژن (ROS) با همکاری یکدیگر باعث آسیب به سلول می‌شوند که به نوبه خود باعث انواع بیماری‌ها می‌شود. RNS به گروهی از مولکولها گفته می‌شود که از نیتریک اکساید (NO) و آنیون سوپراکسید (O_2^-) که به ترتیب توسط آنزیم‌های نیتریک‌اکسیدسنتاز (NOS) و NADPH اکسیداز تولید می‌شوند، مشتق می شوند.

NO از اسیدآمینه آرژینین توسط آنزیم نیتریک‌اکساید سنتاز به کمک O_2 و $NADPH_2$ تولید می‌شود. به طور کلی ۴ نوع آنزیم نیتریک اکساید سنتاز وجود دارد، که شامل nNOS (ایزوزیم بافت عصبی و عضلانی)، iNOS (ایزوزیم سیستم ایمنی و قلبی عروقی)، eNOS (ایزوزیم اندوتلیومی) و bNOS (ایزوزیم باکتریایی) می‌باشند.

به علاوه، نیتریک اکساید به‌عنوان مولکول افکتور و پیامبر فیزیولوژیک در بسیاری از سیستم‌های زیستی از جمله بافت‌های ایمنی، عصبی و سیستم قلبی عروقی و نیز به عنوان یک میانجی در بیماری‌های متعددی از جمله بیماری‌های عروقی، دیابت، ایسکمی کلیوی، سرطان و بیماری‌های التهابی نقش ایفا می کند. لذا، به دلیل نقش NO در سیستم‌های فوق سنجش مقدار آن در بافت‌ها و مایعات زیستی اهمیت زیادی دارد. علی‌رغم این، به دلیل طول عمر بسیار ناپایدار آن، کمّی‌سازی مستقیم آن در سیستم‌ها و روش‌های تشخیصی ممکن نیست. بنابراین رایج‌ترین روش اندازه‌گیری آن سنجش نیتریت (فرآورده نهایی اکسید شده آن) می‌باشد. برای سنجش تشکیل NO، میزان نیتریت (NO_2^-) که یکی از دو فرآورده NO می‌باشد، را اندازه‌گیری می‌کنند. این مولکول برخلاف NO، پایدار و غیرفرار می‌باشد. این روش برای اولین بار توسط گریس (Griess) ارائه شد و به همین دلیل به تست گریس نیز معروف است.

کیت سنجش NO بر اساس واکنش زیر است که در آن NO_2^-با سولفانیل‌آمید و N-۱- نفتیل اتیلن دی آمین دی کلراید (NED) در شرایط اسیدی (فسفریک اسید) واکنش داده و مطابق شکل زیر ترکیب آزو تولید می‌کند.



کیت آرسام فرا زیست NO_2^- را در بسیاری از انواع سیستم‌ها و مایعات بیولوژیک از قبیل پلاسما، سرم، ادرار، محیط کشت سلول و بافت تشخیص می‌دهد. حساسیت کیت حاضر ۰/۱۵ µM یا ۰/۱۵ nmol/ml می‌باشد.

ب) محتویات کیت

	نام ترکیب	۱۰۰ واکنش	۲۰۰ واکنش
۱	بافر لیز	۱۰۰ml	۲×۱۰۰ml
۲	محلول سولفانیل آمید	۵ ml	۱۰ ml
۳	محلول NED	۵ ml	۱۰ ml
۴	استاندارد نیتریت ۱۰ mM	۰/۵ ml	۰/۵ ml
۵	کووت پلاستیکی	۲	۲

نگهداری: محتویات کیت را در دور از روشنایی و در ۴°C نگهداری کنید.

ج) آماده سازی استاندارد نیتریت

قبل از هر سنجش نمونه باید یک منحنی استاندارد نیتریت ترسیم شود. استاندارد و سنجش‌ها را می‌توان هم در کووت و هم در میکروپلیت انجام داد. برای نیل به این هدف بصورت زیر عمل شود.

۱- روش لوله آزمایش یا کووت

- با رقیق کردن ۱:۱۰۰ محلول استاندارد نیتریت موجود در کیت، یک میلی لیتر محلول ۱۰۰µM استاندارد تهیه کرده و سپس به صورت زیر غلظت‌های سریالی تهیه کنید.

آب مقطر (µl)	استاندارد (µl)	غلظت نهایی استاندارد (µM)
۱۰۸۰	۷۲۰	۴۰
۹۰۰	۹۰۰ از مخلوط فوق	۲۰
۹۰۰	۹۰۰ از مخلوط فوق	۱۰
۹۰۰	۹۰۰ از مخلوط فوق	۵
۹۰۰	۹۰۰ از مخلوط فوق	۲/۵
۹۰۰	۹۰۰ از مخلوط فوق	۱/۲۵
۹۰۰	۹۰۰ از مخلوط فوق	۰/۶۲۵
۹۰۰	۹۰۰ از مخلوط فوق	۰/۳۱۲

بعد از تهیه غلظت‌های فوق، به۹۰۰ µl از هر یک از نمونه های استاندارد ۵۰µl از سولفانامید را اضافه کرده و بعد از مخلوط کردن، به مدت ۵

دقیقه در دمای اتاق در تاریکی انکوبه کنید. سپس ۵۰µl از NED بر روی آن ریخته و بعد از مخلوط کردن در طول موج بین ۵۲۰-۵۴۰ nm قرائت شود و نمودار استاندارد آن ترسیم شود.

۲) روش میکروپلیت

در این روش تمامی موارد ذکر شده برای فوق به یک پنجم کاهش یابد. بدین صورت که در یک میکروپلیت ته صاف به صورت دو یا سه تکرار مطابق جدول زیر مخلوط واکنش تهیه شود.

آب مقطر (µl)	استاندارد (µl)	غلظت نهایی استاندارد (µM)
۲۱۶µl	۱۴۴ µl	۴۰
۱۸۰	۱۸۰ از مخلوط فوق	۲۰
۱۸۰	۱۸۰ از مخلوط فوق	۱۰
۱۸۰	۱۸۰ از مخلوط فوق	۵
۱۸۰	۱۸۰ از مخلوط فوق	۲/۵
۱۸۰	۱۸۰ از مخلوط فوق	۱/۲۵
۱۸۰	۱۸۰ از مخلوط فوق	۰/۶۲۵
۱۸۰	۱۸۰ از مخلوط فوق	۰/۳۱۲

به مخلوط فوقµl ۱۰ سولفانامید اضافه کرده و بعد از مخلوط کردن به مدت ۵ دقیقه در دمای اتاق انکوبه شود. در نهایت µl ۱۰ از معرف NED به آن افزوده شده و جذب آن در طول موج بین ۵۲۰-۵۴۰ nm قرائت و سپس با استفاده از میانگین جذب‌ها منحنی استاندارد آن ترسیم شود.

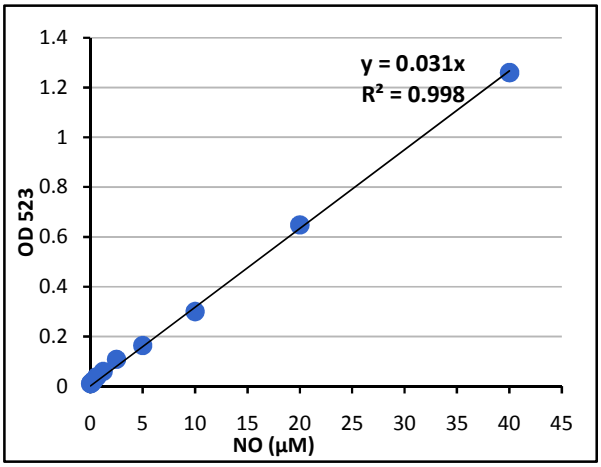
د) سنجش NO_2^- در نمونه

بسته به روش لوله آزمایش یا روش میکروپلیت به ترتیب µl ۲۰ و یا µl ۴ از نمونه را در داخل لوله آزمایش یا چاهک ریخته و سپس به ترتیب بر روی آن ۸۸۰µl و یا µl ۱۷۶ آب مقطر ریخته و مخلوط کنید. در مرحله بعد به ترتیب ۵۰µl و یا µl ۱۰ سولفانامید اضافه کرده و به مدت ۵ دقیقه در دمای اتاق در تاریکی انکوبه شود، در نهایت بعد از افزودنبه ترتیب µl ۵۰ و یا ۱۰µl معرف NED و مخلوط نمودن، آن را در طول موج بین nm ۵۲۰-۵۴۰ قرائت کنید.

ه) آنالیز داده ها

به کمک منحنی استاندارد و با استفاده از معادله خط برازش (Trendline) مقدار X را برای جذب نمونه (های) مجهول پیدا کنید. عدد حاصله مقدار NO را با واحد µM نشان می دهد. با تقسیم عدد NO به مقدار پروتئین موجود (mg/ml) در نمونه مقدار NO برحسب nmol/mg pr به دست می-آید. برای محاسبه غلظت NO برحسب nmol/mg pr لازم است غلظت پروتئین را با روش برادفورد یا لوری می‌توانید سنجش کنید.

منحنی استاندارد زیر به روش لوله آزمایش انجام، جذب آن توسط اسپکتروفتومتر LKB قرائت شده و رسم شده است.



نکات مهم

۱- سولفانیل‌آمید و NED برای اتصال به نیتریت رقابت می‌کنند. برای دستیابی به بیشترین حساسیت دو تا مورد فوق را پشت سر هم و جداگانه اضافه کنید. ابتدا محلول سولفانیل‌آمید را به نمونه اضافه نمایید و بعد از ۱۰-۵ دقیقه محلول NED را بیفزایید.

۲- برای دستیابی به مقدار دقیق NO_2^-یک منحنی استاندارد به کمک استاندارد موجود در کیت توسط آب مقطر یا بافر موجود در نمونه ترسیم شود. به دلیل حساسیت واکنش گریس با مواد مداخله‌گر موجود در محیط واکنش، ممکن است حساسیت کیت تغییر کند.

و) منابع

1) Iverson NM, Hofferber EM, Stapleton JA. Nitric Oxide Sensors for Biological Applications.Chemosensors. 2018;6(1):8.

2) Csonka C, Páli T, Bencsik P, Görbe A, Ferdinandy P, Csont T. Measurement of NO in biological samples. Br J Pharmacol. 2015;172(6):1620-32.

3) Förstermann U, Li H. Therapeutic effect of enhancing endothelial nitric oxide synthase (eNOS) expression and preventing eNOS uncoupling. Br J Pharmacol. 2011;164(2):213-23.