جهت تهیه فایل WORD این مقاله به سایت DaneshResan.com مراجعه نمایید و عنوان مقاله را جستجو کنید
بیش از ۲ میلیون مقاله فارسی در این سایت موجود میباشد

مجله پزشکی کوثر
دوره ۱۵، شماره ۳، پاییز ۱۳۸۹
صفحات: ۱۳۳-۱۲۹

Kowsar Medical Journal
Vol. 15, No. 3, Fall 2010
Pages: 129-133

روش حساس کمی‌لومینسانس برای سنجش فعالیت آنزیم سوپراکسید دیسموتاز

گلنوش دهباشی بهبهانی[۱] *MSc*، رضا حاج‌حسینی[۱] *PhD*، لاله حقوقی‌راد[۲] *MSc*، مهدی هدایتی[*] *PhD*

[*]مرکز تحقیقات پیشگیری و درمان چاقی، پژوهشکده علوم غدد درون‌ریز و متابولیسم، دانشگاه علوم پزشکی شهید بهشتی، تهران، ایران

[۱]گروه زیست‌شناسی، دانشکده علوم پایه، واحد مرکزی، دانشگاه پیام نور، تهران، ایران

[۲]مرکز تحقیقات پیشگیری و درمان چاقی، پژوهشکده علوم غدد درون‌ریز و متابولیسم، دانشگاه علوم پزشکی شهید بهشتی، تهران، ایران

چکیده

اهداف: سنجش فعالیت آنزیم سوپراکسید دیسموتاز در بیماری‌های شایعی مانند بیماریهای قلبی عروقی، سرطان و اختلالات خودایمنی اهمیت دارد. در حال حاضر سنجش فعالیت این آنزیم در زمینه‌های مختلف علمی با کیت‌های وارداتی گران‌قیمت انجام می‌شود. هدف مطالعه حاضر طراحی روش کمی لومینومتری برای سنجش فعالیت آنزیم مذکور به همراه بهبود حساسیت، دقت و سرعت سنجش بود.

مواد و روش‌ها: در این روش جهت اندازه‌گیری فعالیت آنزیم سوپراکسید دیسموتاز در نمونه سرمی به منظور افزایش حساسیت سنجش، از واکنش سوپراکسید با سوبسترای لومینول و یدوفنول به عنوان شتاب دهنده واکنش در سنجش لومینومتری استفاده شد. حساسیت، دقت درون آزمونی و برون آزمونی، صحت با آزمون‌های بازیافت و همسانی، قیاس روش و بررسی همبستگی و توافق روش‌ها انجام شد. به منظور افزایش دقت و سرعت خواندن، سنجش در میکروپلیت اجرا و خواندن با پلیت لومینومتر صورت گرفت.

یافته‌ها: دامنه عملکرد استاندارد از ۳ تا ۳۰۰ واحد در میلی لیتر بود. حساسیت روش مورد مطالعه در حد ۰/۱ واحد در میلی لیتر محاسبه شد. درصد ضریب تغییرات درون آزمونی و برون آزمونی به ترتیب کمتر از ۶/۶ و ۷/۳ بود. در این روش درصد بازیافت در آزمون‌های همسانی و بازیافت در محدوده ۹۲ تا ۱۱۰ بود. مقایسه نتایج روش مذکور با روش رایج رنگ سنجی ضریب همبستگی پیرسون را ۰/۹۱۷ نشان داد.

نتیجه‌گیری: این روش قادر به اندازه گیری فعالیت آنزیم سوپراکسید دیسموتاز در نمونه های سرمی با دقت و صحت قابل قبول است و احتمالا می‌تواند جایگزین مناسبی برای روش‌های رنگ‌سنجی رایج وارداتی باشد.

کلیدواژه‌ها: کمی‌لومینسانس، سوپراکسید دیسموتاز، خواندن میکروپلیت

Sensitive chemiluminescence method for Superoxide Dismutase activity assay

Dehbashi Behbahani G.[1] *MSc*, Hajhosseini R.[1] *PhD*, Hoghughirad L.[2] *MSc*, Hedayati M.* *PhD*

*Obesity Research Center, Research Institute for Endocrine Sciences,
Shahid Beheshti University of Medical Sciences, Tehran, Iran
[1]Department of Biology, Faculty of Basic Science, Central Branch, Payam-e-Noor University, Tehran, Iran
[2]Obesity Research Center, Research Institute for Endocrine Sciences,
Shahid Beheshti University of Medical Sciences, Tehran, Iran

Abstract

Aims: Measuring superoxide dismutase activity is of importance in common diseases like cardiovascular disease, cancer and autoimmune disorders. Nowadays measuring enzyme activity is performed with expensive imported kits in different fields of science. The aim of this study was to design a quantitative method for chemiluminometeric measurement of superoxide dismutase activity with improved sensitivity, accuracy and speed.

Materials & Methods: In this method luminol substrate and iodophenol were used as reaction accelerators in luminometry measuring reaction in order to determine the superoxide dismutase activity in serum samples and to increase measurement sensitivity. Sensitivity, precision tests, intra and inter-assay test, accuracy tests, recovery and parallelism tests, method comparison and methods' correlation and coherence investigation were also performed. In order to increase reading speed and precision, measurement was performed in microplate and reading was done in luminometry plate.

Results: Standard operating range was 3 to 300 U/ml. Sensitivity of the method was 0.1U/ml. Intra and inter-assay coefficient of variation was less than 6.6 and 7.3% respectively. In recovery and Parallelism tests, the recovery percent range was 92 to 110. Comparison of common colorimetric method and the designed method indicated a Pearson's correlation coefficient of 0.917.

Conclusion: This method can measure superoxide dismutase activity in serum samples with acceptable precision and accuracy and probably can be a good alternative for conventional colorimetric methods.

Keywords: Chemiluminescence, Superoxide Dismutase, Microplate Reading Format

نویسنده مسئول: مهدی هدایتی. تمام درخواست‌ها باید به نشانی hedayati@endocrine.ac.ir فرستاده شوند.

دریافت مقاله: ۸۹/۲/۱۴ پذیرش مقاله: ۸۹/۶/۱

جهت تهیه فایل WORD این مقاله به سایت DaneshResan.com مراجعه نمایید و عنوان مقاله را جستجو کنید
بیش از ۲ میلیون مقاله فارسی در این سایت موجود میباشد

مقدمه

آنزیم سوپراکسیددیسموتاز (SOD) یکی از آنزیم‌های کلیدی دفاع آنتی‌اکسیدانی بدن در برابر آسیب‌های ناشی از رادیکال‌های آزاد است. این آنزیم، واکنش تبدیل دو رادیکال آنیون سوپراکسید به پراکسیدهیدروژن و اکسیژن مولکولی را سرعت می‌بخشد و لذا باعث جمع‌آوری رادیکال‌های مضر مذکور می‌شود. بدین‌ترتیب جانداران هوازی در برابر آسیب‌های ناشی از استرس اکسیداتیو محافظت می‌شوند [۱].

آنزیم سوپراکسیددیسموتاز در تمام بافت‌های هوازی وجود دارد و جایگاه سلولی آن داخل سیتوزول و میتوکندری است [۲]. در تمامی موجودات زنده هوازی، اهمیت دفاع سلول توسط آنزیم سوپراکسیددیسموتاز در برابر آسیب‌های اکسایشی گونه‌های فعال اکسیژنی نشان داده شده است. اهمیت این آنزیم به‌حدی است که گونه‌های جهش‌یافته *E. coli* که آنزیم سوپراکسیددیسموتاز را ندارند، به‌شدت نسبت به آسیب‌های اکسایشی حساس هستند [۳]. در بیماری‌هایی مثل سرطان، دیابت قندی، پارکینسون، آلزایمر، کم‌خونی یا آنمی، دیستروفی ماهیچه‌ای و آرتریت‌روماتوئید، دخالت استرس اکسیداتیو مشخص شده است. طی اکسیداسیون خودبه‌خود هموگلوبین به مت‌هموگلوبین در گویچه‌های قرمز، رادیکال سوپراکسید تشکیل می‌شود. در سایر بافت‌ها، رادیکال آزاد سوپراکسید در نتیجه عمل آنزیم‌هایی مثل سیتوکروم P450 اکسیداز و گزانتین‌اکسیداز به‌وجود می‌آید. آنیون سوپراکسید، خودبه‌خود، به O_2 و H_2O_2 تبدیل می‌شود، اما سرعت این واکنش بسیار آهسته است و آنزیم SOD قادر است سرعت واکنش مذکور را به‌نحو بارزی افزایش دهد [۴].

در انسان مانند سایر پستانداران و اغلب مهره‌داران، سه شکل از آنزیم سوپراکسیددیسموتاز وجود دارد؛ آنزیم SOD1 در سیتوپلاسم، SOD2 در میتوکندری و SOD3 در خارج سلول قرار دارد. آنزیم SOD1 به‌صورت دیمر یعنی متشکل از ۲ بخش بوده، در حالی که دو آنزیم دیگر به‌صورت تترامر یا چهار زیرواحدی هستند. آنزیم‌های SOD1 و SOD3 در جایگاه فعال خود دارای عناصر فلزی مس و روی و آنزیم SOD2 در جایگاه فعال خود حاوی فلز منگنز است [۵]. سوپراکسیدها یکی از مهم‌ترین گونه‌های فعال اکسیژنی در سلول بوده و به‌همین دلیل، آنزیم‌های SOD نقش آنتی‌اکسیدانی مهمی دارند. اهمیت فیزیولوژیکی آنزیم‌های SOD با آزمایشات آسیب‌شناسی در مطالعه حیوانی روی موش‌ها نشان داده شده است. موش‌های مذکور با کمک روش‌های مهندسی ژنتیک، فاقد ژن‌های فعال آنزیم‌های سوپراکسیددیسموتاز بودند [۶]. اغلب روش‌های رایج برای سنجش فعالیت آنزیم سوپراکسیددیسموتاز از واکنش‌های رنگ‌سنجی بهره می‌گیرند. در واکنش‌های مذکور با تخریب رادیکال سوپراکسید، ابتدا پراکسیدهیدروژن تولید شده و سپس این مولکول با ماده رنگ‌زا یا کروموژن واکنش می‌دهد. میزان رنگ تشکیل‌شده با فعالیت این آنزیم متناسب است [۷].

در بیشتر روش‌های موجود برای اندازه‌گیری فعالیت SOD از سیستم تولید سوپراکسید استفاده می‌شود. سپس توانایی محلول استاندارد یا نمونه مجهول در مهار واکنش سوپراکسید به‌وسیله آشکارساز، مورد سنجش قرار می‌گیرد. به‌منظور آشکارسازی نتیجه واکنش، استفاده از سیتوکروم C یا نمک‌های تترازولیوم مانند NBT (نیتروبلوتترازولیوم) بسیار رایج است. متاسفانه احیای سیتوکروم توسط ردوکتازهای موجود در نمونه از محدودیت‌های جدی استفاده از این ترکیب محسوب می‌شود. حلالیت ضعیف NBT احیاشده با رادیکال سوپراکسید از مشکلات استفاده از نمک‌های تترازولیوم است. خواندن نتیجه این واکنش‌ها اغلب از نوع اسپکتوفتومتری جذبی با حساسیت حدود ۱ واحد در میلی‌لیتر است [۶]. حساسیت روش‌های نشری مانند فلوریمتری و لومینومتری از روش‌های جذبی مانند رنگ‌سنجی جذبی بیشتر است [۸].

هدف از این مطالعه، طراحی روش سنجش لومینومتری برای فعالیت آنزیم سوپراکسیددیسموتاز بود.

مواد و روش‌ها

ابتدا هر یک از محلول‌های مورد نیاز با استفاده از ترکیبات شیمیایی و آنزیمی با درجه خلوص بالا شامل سدیم‌فسفات، دی‌سدیم‌فسفات، لومینول، ۴-یدوفنول، پراکسیدهیدروژن، آنزیم گزانتین‌اکسیداز، گزانتین، آزیدسدیم و آنزیم پراکسیداز (Merck؛ آلمان، Sigma؛ ایالات متحده) به شرح زیر تهیه شدند:

محلول لومینول: میزان ۱۷۷ میلی‌گرم از ترکیب مذکور با جرم مولکولی ۱۷۷ دالتون در ۱۰۰ میلی‌لیتر بافر فسفات با pH ۷/۴ و غلظت ۱۰۰ میلی‌مولار حل شد تا محلولی با غلظت ۱۰ میلی‌مولار حاصل شود. این محلول هربار، تازه تهیه می‌شد.

محلول ٤-یدوفنول: برای تهیه محلول ۰/۵ میلی‌مولار آن، میزان ۱/۱ میلی‌گرم از ترکیب مذکور با جرم مولکولی ۲۲۰ دالتون در ۱۰ میلی‌لیتر از بافر فسفات تهیه‌شده با pH ۷/۴، حل شد.

محلول پراکسیدهیدروژن: برای تهیه محلول ۱۰ میلی‌مولار پراکسیدهیدروژن، (با جرم مولکولی ۳۴، محلول ۳۰٪ و دانسیته ۱/۱۱ گرم بر میلی‌لیتر)، ۱۰۲ میکرولیتر از ترکیب مذکور توسط بافر فسفات به حجم ۱۰۰ میلی‌لیتر رسانده شد.

محلول استاندارد سوپراکسیددیسموتاز: ۲/۶۷ میلی‌لیتر از محلول ذخیره آنزیم سوپراکسیددیسموتاز خریداری‌شده که حاوی ۳۲۰۰ واحد در میلی‌لیتر بود، به‌کمک بافر فسفات به حجم ۱۰ میلی‌لیتر رسانده شد تا محلولی با غلظت ۱۰۰۰ واحد در میلی‌لیتر ساخته شود. از این محلول غلظت‌های استاندارد به‌صورت تازه از ۳ تا ۳۰۰ واحد در میلی‌لیتر تهیه می‌شد.

محلول آنزیم پراکسیداز (HRP): ۰/۱ میلی‌لیتر از محلول ذخیره آنزیم پراکسیداز خریداری‌شده که حاوی ۲۰۰ واحد در میلی‌لیتر

جهت تهیه فایل WORD این مقاله به سایت DaneshResan.com مراجعه نمایید و عنوان مقاله را جستجو کنید
بیش از ۲ میلیون مقاله فارسی در این سایت موجود میباشد

بود، به‌کمک بافر فسفات به حجم ۱۰ میلی‌لیتر رسانده شد تا محلولی با غلظت ۲ واحد در میلی‌لیتر ساخته شود. از این محلول برای کاتالیز واکنش میان لومینول و پراکسیدهیدروژن استفاده شد.

محلول گزانتین: از پودر گزانتین با جرم مولکولی ۱۵۲ دالتون در بافر فسفات، محلول ۰/۰۵ میلی‌مولار تهیه شد.

محلول گزانتین‌اکسیداز: از پودر آنزیم گزانتین‌اکسیداز در بافر فسفات، محلولی با فعالیت ۸۰ واحد در میلی‌لیتر تهیه شد. این محلول به‌اندازه نیاز و تازه تهیه می‌شد. از این محلول به‌همراه محلول گزانتین برای تولید آنیون سوپراکسید استفاده شد.

لازم به ذکر است که تمامی محلول‌های فوق از زمان تهیه تا استفاده در یخچال در دمای ۲ تا ۸ درجه سانتی‌گراد نگهداری شدند. برای توزین ترکیبات مورد نیاز از ترازوی آنالیتیک (Analytical Balance, Sartorius؛ آلمان) و برای اندازه‌گیری pH از دستگاه pHمتر (Mettler, MP220؛ سوییس) استفاده شد. پس از بهینه‌نمودن شرایط، به‌طور خلاصه در میکروپلیت ۹۶ چاهکی مخصوص خواندن لومینسانس (Nunc C؛ دانمارک)، به هر چاهک محتوی ۱۰ میکرولیتر نمونه سرمی، ۴۰ میکرولیتر محلول گزانتین‌اکسیداز، ۲۰۰ میکرولیتر محلول گزانتین، ۴۰ میکرولیتر محلول لومینول، ۱۰ میکرولیتر محلول یدوفنول و ۱۰ میکرولیتر آنزیم پراکسیداز اضافه شد.

پس از تولید سوپراکسید آنیون توسط سیستم گزانتین/گزانتین‌اکسیداز، آنزیم سوپراکسیددیسموتاز، آن را تجزیه کرده و پراکسیدهیدروژن تولید می‌نماید. این پراکسید در مجاورت یدوفنول به‌عنوان "فزاینده" با لومینول واکنش می‌دهد و آنزیم پراکسیداز این واکنش را سرعت می‌بخشد.

فوتون‌های ساطع‌شده از واکنش لومینول با پراکسیدهیدروژن توسط دستگاه لومینومتر (Lumistar, BMG Co.؛ اتریش) سنجیده شد. در دستگاه لومینومتر مورد استفاده هر یک واحد نسبی لومینسانس (RLU) معادل دریافت ۱۰ فوتون توسط آشکارساز دستگاه مذکور بود.

با ترسیم سیگنال‌های لومینسانس در مقابل غلظت‌های معین استاندارد، منحنی استاندارد ترسیم شد. غلظت نمونه‌های مجهول براساس منحنی مذکور توسط برنامه نرم‌افزاری دستگاه موردنظر محاسبه شد.

به‌منظور ارزیابی اعتبار روش، دقت، صحت و حساسیت آن مورد بررسی قرار گرفت. دقت روش براساس آزمون‌های درون‌سنجش و برون‌سنجش انجام شد. در این بررسی از نمونه‌هایی با غلظت پایین، متوسط و بالا با تکرار هشت‌گانه بهره گرفته شد. براساس حاصل تقسیم میانگین بر انحراف‌معیار ضرب در ۱۰۰، درصد ضریب تغییرات (CV%) بررسی شد.

صحت روش نیز به‌کمک آزمون‌های بازیافت و پاراللیزم (همسانی) انجام شد. برای مقایسه نتایج روش مورد بررسی با روش رنگ‌سنجی به‌عنوان روش رایج، کیت رنگ‌سنجی آنزیمی (کمپانی راندوکس؛ انگلستان) به‌منظور سنجش فعالیت آنزیم سوپراکسیددیسموتاز مورد استفاده قرارگرفت.

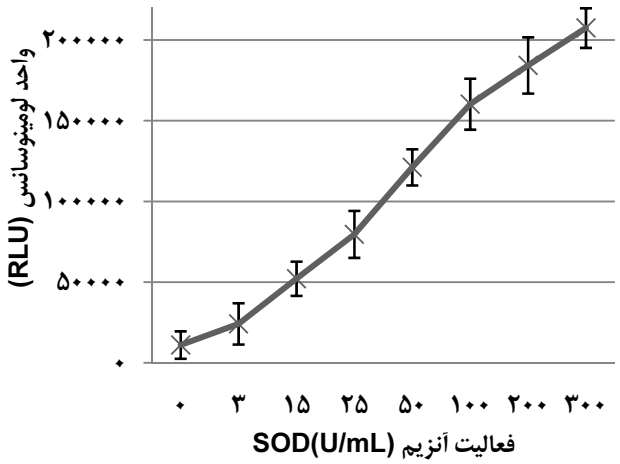
علت انتخاب این کیت این بود که در هر دو روش از سیستم گزانتین–گزانتین‌اکسیداز برای تولید سوپراکسید استفاده می‌شد. به‌طور خلاصه طبق دستورالعمل کیت به ۵/۶ میکرولیتر از نمونه یا استاندارد، ۱۸۹ میکرولیتر از معرف شماره ۱ حاوی مخلوط سوبستراها و سپس ۲۸ میکرولیتر از معرف شماره ۲ حاوی آنزیم گزانتین‌اکسیداز اضافه شد. در ابتدا و ۵ دقیقه پس از افزودن معرف شماره ۲ جذب نوری در طول موج ۵۵۰ نانومتر اندازه‌گیری شد. برای این منظور یعنی اندازه‌گیری جذب نوری نتایج کیت رنگ‌سنجی راندکس، از دستگاه الایزا پلیت ریدر (Sunrise, Tecan Co.؛ اتریش) استفاده شد.

در بررسی مقایسه نتایج روش مورد بررسی و روش رنگ‌سنجی رایج از ضریب همبستگی پیرسون استفاده شد.

غلظت مربوط به میانگین سیگنال استاندارد صفر، با تکرار ده‌گانه به‌علاوه دو برابر انحراف استاندارد آن (Mean+2SD)، مبنای تعیین حساسیت روش قرار گرفت.

نتایج

نمونه‌ای از منحنی استاندارد با تکرار هشت‌گانه نقاط در نمودار ۱ آورده شده است. جدول ۱ حاوی داده‌های مربوط به بررسی دقت روش با آزمون‌های درون‌سنجش و برون‌سنجش است. همان‌طور که یافته‌های مذکور نشان می‌دهند روش مورد بررسی از دقت قابل قبولی برخوردار بوده است.



نمودار ۱) منحنی استاندارد با تکرار هشت‌گانه نقاط سنجش آنزیم سوپراکسیددیسموتاز به‌روش کمی‌لومینسانس و خواندن میکروپلیتی

در بررسی صحت روش، نتایج آزمون‌های بازیافت و همسانی در جدول ۲ ارایه شده است. یافته‌های این جدول حاکی از قابل قبول بودن صحت روش مورد بررسی است.

همان‌طور که اشاره شد، حساسیت روش، معادل ۰/۱ واحد در میلی‌لیتر محاسبه شد. نمودار ۲ نیز حاوی نتایج حاصل از مقایسه روش مورد بررسی با نتایج حاصل از کیت رنگ‌سنجی است.

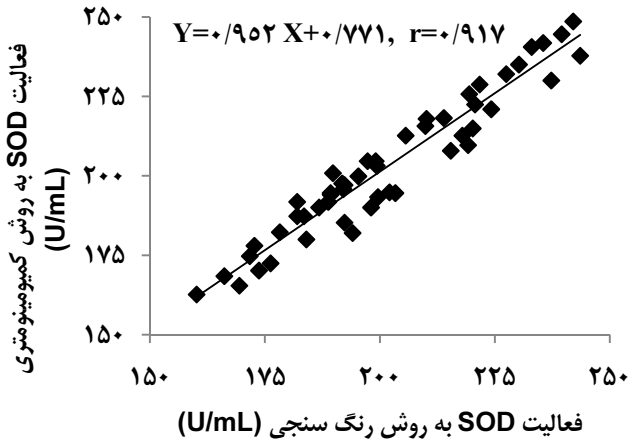
جدول ۱) نتایج حاصل از بررسی ضریب تغییرات درون‌آزمونی و برون‌آزمونی سنجش آنزیم سوپراکسیددیسموتاز به‌روش کمی‌لومینسانس و خواندن میکروپلیتی با تکرار هشت‌گانه

آزمون	محدوده غلظت	میانگین (U/mL)	انحراف معیار	درصد ضریب تغییرات
درون سنجش	پایین	۱۲۰	۷/۹۲	۶/۶
	وسط	۲۴۰	۹/۱۲	۳/۸
	بالا	۳۶۰	۲۰/۵۲	۵/۷
برون سنجش	پایین	۱۵۰	۱۰/۹۵	۷/۳
	وسط	۲۵۰	۱۰/۲۵	۴/۱
	بالا	۳۵۵	۲۲/۰۱	۶/۲

جدول ۲) نتایج حاصل از آزمون بازیافت و آزمون همسانی برای تعیین صحت روش سنجش آنزیم سوپراکسیددیسموتاز به‌روش کمی‌لومینسانس و خواندن میکروپلیتی

آزمون	محدوده غلظت	استاندارد (U/mL)	مورد انتظار (U/mL)	اندازه‌گیری‌شده (U/mL)	درصد بازیافت
بازیافت (نمونه حاوی ۶۶ U/mL)	پایین	۶۰	۶۳	۶۶	۱۰۵
	وسط	۱۵۰	۱۰۸	۱۱۱	۱۰۳
	بالا	۳۰۰	۱۸۳	۲۰۱	۱۱۰

	نمونه	رقت	مورد انتظار (U/mL)	اندازه‌گیری‌شده (U/mL)	نسبت درصد
همسانی	اول	۱	۲۴۰	۲۴۰	۱۰۰
	دوم	۲	۱۲۰	۱۲۶	۱۰۵
	سوم	۴	۶۰	۵۵	۹۲
	چهارم	۸	۳۰	۳۱	۱۰۳
	پنجم	۱۶	۱۵	۱۶	۱۰۷
	ششم	۳۲	۷/۵	۸/۱	۱۰۹



نمودار ۲) مقایسه نتایج حاصل از روش سنجش فعالیت آنزیم سوپراکسیددیسموتاز به‌روش کمی‌لومینسانس و خواندن میکروپلیتی با روش رنگ‌سنجی رایج

بحث

در این مطالعه با توجه به اهمیت سنجش فعالیت آنزیم سوپراکسیددیسموتاز، فعالیت آنزیم مذکور در نمونه‌های سرمی انسان با روش کمی لومینسانس حساس مورد سنجش قرار گرفت. در اصل در این تحقیق، پنج رویکرد محققان در بهبود سنجش فعالیت این آنزیم که به‌طور مجزا گزارش شده‌اند، همگی با هم پس از بهینه‌نمودن شرایط واکنش مورد استفاده قرار گرفتند تا نهایتا روشی شامل همه مزایای مذکور حاصل شود.

به‌منظور تولید آنیون سوپراکسید، از سیستم کارآمد آنزیمی گزانتین‌اکسیداز طبق گزارش *کوربیسر* و همکاران استفاده شد [۹]. این اولین رویکرد در روش مورد بررسی بود که برای تولید سوبسترای آنزیم سوپراکسیددیسموتاز، از سیستم آنزیمی دردسترس‌تر و کارآمدتر نسبت به سایر روش‌های شیمیایی و آنزیمی استفاده نمود. استفاده از سیستم سیتوکروم‌اکسیداز، احتمال مهار توسط مواد موجود در نمونه را مطرح می‌کند. در روش سنجش فعالیت SOD توسط *مک‌کورد* و همکاران از سیستم آنزیمی گزانتین- گزانتین‌اکسیداز برای تولید سوپراکسید آنیون استفاده شد، اما در روش آشکارسازی رنگ‌سنجی، حساسیت روش حدود ده برابر کمتر بود [۱۰].

با بهینه‌نمودن شرایط در این بررسی، میزان مصرف آنزیم گزانتین‌اکسیداز نسبت به سایر گزارشات کاهش یافت [۱۱]، به‌طوری که برای تولید آنیون سوپراکسید از سیستم کارآمد گزانتین–گزانتین‌اکسیداز به‌میزان کمتر از ۴ واحد در واکنش بهینه‌شده استفاده شد، در حالی که در اغلب روش‌های گزارش‌شده حدود ۱۰ واحد آنزیم در واکنش به‌کار می‌رفت.

در رویکرد دوم، اغلب روش‌های گزارش‌شده و کیت‌های در دسترس، از روش‌های رنگ‌سنجی و رنگ‌زاهای (کروموژن) تترازولیوم بهره گرفته‌اند. اما در این روش به‌منظور افزایش حساسیت از سیستم سیگنال‌دهی لومینسانس حاصل از اکسیداسیون لومینول استفاده شد که ارزان‌قیمت بوده و برخلاف رنگ‌زاهای تترازولیوم، حلالیت بیشتری در محیط آبی داشته و سیگنال بیشتری تولید می‌کند.

تروپ و همکاران از ترکیبات فنول برای افزایش سرعت واکنش لومینول استفاده نمودند [۱۲]. لذا در رویکرد سوم برای افزایش سیگنال‌های دریافتی و بهبود هرچه بیشتر حساسیت روش، از "فزاینده" گروه یدوفنول یعنی ۴-یدوفنول استفاده شد. این ترکیب در زمان کوتاه‌تر سبب افزایش سیگنال می‌شود.

برخی گزارشات از آنزیم پراکسیداز برای سرعت‌بخشیدن واکنش لومینول با پراکسیدهیدروژن استفاده نموده‌اند [۱۳]. لذا در چهارمین رویکرد، هرچند واکنش محصول آنزیم سوپراکسیددیسموتاز با لومینول خودبه‌خود انجام می‌شود، اما برای بهبود کارآیی و کاهش زمان آزمایش از آنزیم پراکسیداز (HRP) برای شتاب‌دهی واکنش نهایی استفاده شد که در این روش از زمان کل آزمایش حداقل به‌میزان ۵ دقیقه کاسته شد.

نهایتا به‌عنوان قدم پنجم در این مطالعه مانند گزارش *ادوین* و *جانرو* به‌منظور افزایش دقت از روش انجام و خواندن در میکروپلیت ۹۶چاهکی استفاده شد. البته روش مذکور رنگ‌سنجی براساس واکنش تترازولیوم آبی بود و حساسیت آن نیز کمتر از روش‌های لومینومتری بود [۱۴]. با این تغییر علاوه بر بهبود دقت و تکرارپذیری نتایج، حجم مواد مصرفی کاهش یافت و زمان کل آزمایش نیز کوتاه شد.

نتیجه‌گیری

روش حساس کمی‌لومینسانس می‌تواند فعالیت آنزیم سوپراکسیددیسموتاز را در نمونه‌های سرمی با دقت و صحت قابل قبولی اندازه‌گیری کند و جایگزین مناسبی برای روش‌های رنگ‌سنجی رایج باشد.

منابع

1- Fridovich I. Superoxide dismutase. Adv Enzymol Relat Areas Mol Biol. 1974;41:35-97.

2- Sun Y, Oberley LW, Li Y. A simple method for clinical assay of superoxide dismutase. Clin Chem. 1988;34(3):496-500.

3- McCord JM, Fridovich I. Superoxide dismutase: An enzymes function for erythrocuperin. J Biol Chem. 1969;244:49-55.

4- Del Villano BC, Tischfleld JA. A radioimmune assay for human cupro-zinc superoxide dismutase and its application to erythrocytes. J Immunol Methods. 1979;29:253-62.

5- Corpas FJ, Fernandez-Ocana A, Carreras A, Valderrama R, Luque F, Esteban FJ, et al. The expression of different superoxide dismutase forms is cell-type dependent in olive leaves. Plant Cell Physiol. 2006;47(7):984-94.

6- Li Y, Huang TT, Carlson EJ, Melov S, Ursell PC, Olson JL. Dilated cardiomyopathy and neonatal lethality in mutant mice lacking manganese superoxide dismutase. Nat Genet. 1995;11(4):376-81.

7- Peskin AV, Winterbourn CC. A microtiter plate assay for superoxide dismutase using a Water-Soluble Tetrazolium salt (WST-1). Clin Chim. 1999;293:157-66.

8- Kubota S, Sate N, Matsumura T, Kamada T. Chemiluminescence and superoxide dismutase in the plasma in patients with alcoholic and non-alcoholic liver injuries. Alcohol. 1985;2:469-72.

9- Terence MM, Han V, Thuyhuong N. The superoxide synthases of rose cells. Plant Physiol. 1998;117:1301-5.

10- Chang LY, Slot JW, Geuze HJ, Crapo JD. Molecular immunocytochemistry of the CuZn superoxide dismutase in rat hepatocytes. J Cell Biol. 1988;107(6):2169-79.

11- Yi Sun, Lary W, Ying Li. A simple method for clinical assay of superoxide dismutase. Clin Chem. 1988;34(3):497-500.

12- Thorp GH, Kricka LJ, Moseley SB, Whitehead TP. Phenols as enhancers of the chemiluminescent horseradish peroxidase luminal hydrogen peroxide reaction: Application in luminescence monitored enzyme immunoassays. Clin Chem. 1985;31:1335-41.

13- Navas Diaz A, Garcia Sanchez F, Gonzalez Garcia JA. Hydrogen peroxide assay by using enhanced chemiluminescence of the luminol-H2O2-horseradish peroxidase system: Comparative studies. Analytica Chemica Acta. 1996;28:161-5.

14- Ewing JF, Janero DR. Microplate superoxide dismutase assay employing a non-enzymatic superoxide generator. Anal Biochem. 1995;10(2):243-8.