کیت سنجش فعالیت آنزیم گلوتاتیون پراکسیداز

Nagpix™ (Glutathione Peroxidase Activity Assay Kit)

V_ 0.5

مقدمه:

آنزیم گلوتاتیون‌پراکسیداز (GPx) آنزیمی است که در بخش‌های سیتوپلاسمی و میتوکندری سلول یافت می‌شود. گلوتاتیون پراکسیدازها، گروهی از آنزیم‌ها هستند که در حفاظت از ارگانیسم‌ها در برابر آسیب اکسیداتیو نقش مهمی دارند. این آنزیم، گلوتاتیون کاهشی (GSH) را به گلوتاتیون اکسید شده (GSSG) در طی کاهش هیدروپراکسیدهای چربی به الکل یا پراکسید هیدروژن آزاد را، به آب تبدیل می‌کند. سطوح نرمال این آنزیم در پیشگیری از بسیاری از بیماری‌ها، از جمله سرطان و بیماری‌های قلبی عروقی می‌تواند ارتباط داشته باشد.

آنزیم گلوتاتیون‌پراکسیداز باعث کاهش هیدروپراکسیدکومن در هنگام اکسیداسیون GSH به GSSG می‌شود و در ادامه GSSG با مصرف NADPH توسط آنزیم گلوتاتیون ردوکتاز به GSH کاهش می‌یابد. در این واکنش، NADPH مصرف شده به‌عنوان یک مارکرتعیین مقدار GPx در نظر گرفته می‌شود و در طول موج 340 نانومتر میزان فعالیت GPx را تعیین می‌کند. این سنجش برای اندازه‌گیری تمام پراکسیدازهای وابسته به گلوتاتیون در پلاسما، لیزات اریتروسیت، هموگلوبین و لیزات سلولی با حساسیت ۰/۵ mU/ml کاربرد دارد.

محتوای کیت:

1. **Reagent 1**: 2 ویال (کیت 48 تستی)/ 4 ویال (کیت 96 تستی)
2. **Reagent 2** : 100 میکرولیتر
3. **Assay Buffer** : 12.5میلی‌لیتر (کیت 48تست)/ 25میلی‌لیتر(کیت 96 تست)
4. **Standard**: 1 ویال

موارد مورد نیازکه در داخل کیت موجود نیست:

- PBS (برای نمونه های بافتی)
- هموژنایزر شیشه ای (هموژنایزر نوند سلامت با کد محصول 16010)
- سانتریفیوژ
- میکروپلیت ریدر با قابلیت خوانش 340 نانومتر

مراحل انجام آزمایش:

1) آماده‌سازی نمونه‌ها:

توجه ۱: برای دستیابی به نتایج بهتر، توصیه می‌شود ابتدا چند نمونه را برای تعیین محدوده اندازه‌گیری مورد سنجش قرار دهید سپس رقت‌های مختلف بر اساس این سنجش انجام گیرد.

- نمونه‌های بافتی و نمونه‌های سلولی:

1. مقدار 100 میلی گرم بافت و یا $۲×۱۰^{۶}$ سلول مورد نیاز برای هر آزمایش را برداشته و با PBS سرد شست و شو دهید.

لوله (چاهک)	استاندارد ۱ میلی‌مول (میکرولیتر)	آب مقطر (میکرولیتر)	غلظت نهایی استاندارد (nM)
A	۰	۶۰	۰
B	۱۲	۴۸	20
C	۲۴	۳۶	40
D	36	۲۴	60
E	۴۸	۱۲	80
F	۶۰	0	100

2. ۲۰۰ میکرولیتر از Assay Buffer سرد را به نمونه اضافه کرده و هموژن نمایید (بدین منظور می‌توانید از هموژنایزر شیشه‌ای نوند سلامت با کد محصول 16010 استفاده کنید).
3. محلول را 15 دقیقه در دمای 4 درجه سانتی‌گراد در 9000 دور سانتریفیوژ کنید.
4. محلول رویی را جدا کرده و از آن به عنوان نمونه استفاده کنید (تا زمان استفاده در دمای یخچال و یا روی یخ نگهداری شود)

- اریتروسیت:

1. گلبول‌های قرمز جدا شده را با نسبت ۱:۱ با **Assay Buffer** سرد، مخلوط و هموژن کنید. سپس به مدت 15 دقیقه در دمای 4 درجه سانتی‌گراد در 9000 دور سانتریفیوژ کنید.
2. محلول رویی را جدا و به عنوان نمونه از آن استفاده نمایید.

- سرم و پلاسما:

نمونه های سرمی را با در نظر داشتن «توجه ۱» می‌توان به طور مستقیم یا رقیق شده، در چاهک‌ها مورد ارزیابی قرار داد (نمونه‌ها را می‌توان در دمای 80- درجه سانتی گراد نگهداری کرد).

2) آماده‌سازی محلول کار:

الف) **Reagent 1**: به هر تیوب حاوی پودر Reagent 1 مقدار یک میلی‌لیتر Assay Buffer اضافه نمایید. هر تیوب R1 پس از افزودن Assay Buffer برای 25 تست کافی است و در دمای ۲۰- درجه سانتی‌گراد به مدت یک ماه قابل نگهداری است.

ب) **Reagent 2**: محلول را بصورت کامل ورتکس نموده تا محلول همگن به دست آید. محلول را با نسبت ۱:۱۰۰۰ با آب دیونیزه رقیق نمایید. محلول آماده‌شده R2 در دمای ۲۰- درجه سانتی‌گراد به مدت یک ماه قابل نگهداری است.

ج) **محلول استاندارد:** به هر تیوب Standard مقدار 1 میلی‌لیتر آب دیونیزه اضافه نموده و از این محلول به عنوان استاندارد جهت رسم منحنی استفاده کنید. محلول استاندارد آماده شده، دارای غلظت یک میلی مولار از NADPH است و در دمای ۲۰- درجه سانتی‌گراد به‌مدت یک ماه قابل نگهداری است.

3) رسم منحنی استاندارد:

ابتدا رقت‌های مختلف محلول استاندارد را با استفاده از جدول زیرتهیه کرده و برای رسم منحنی استاندارد از آن استفاده نمائید.

4)روش کار:

الف) ابتدا 50 میکرولیتر از نمونه یا استاندارد را در چاهک‌های پلیت 96 خانه ریخته (پیشنهاد می‌شود از هر نمونه دو تکرار انجام دهید و مقادیر میانگین را بصورت عدد نهایی در فرمول لحاظ کنید). در ادامه به همه چاهک‌ها، 40 میکرولیتر R1 آماده شده را اضافه کرده و سپس به مدت 15 دقیقه در دمای اتاق انکوبه کنید.

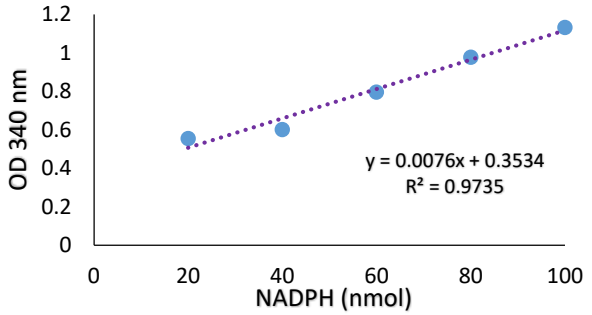
توجه ۲: قبل از افزودن R2، جذب نوری نمونه‌ها را در ۳۴۰ نانومتر اندازه بگیرید. اگر OD در 340 نانومتر کمتر از ۱/۰ باشد، می‌توانید با اضافه کردن محلول استاندارد به چاهک، جذب نوری را به بالای ۱ برسانید. توجه داشته باشید که افزودن هر میلی‌لیتر از محلول استاندارد به‌صورت تقریبی ۰/۵ واحد به OD اضافه خواهد کرد.

ب) برای شروع واکنش، 10 میکرولیتر از R2 را اضافه کرده و خوب مخلوط کنید. جذب نوری نمونه‌ها را در طول موج 340 نانومتر قرائت و یادداشت کنید.

ج) به مدت ۵ تا ۱۰ دقیقه در دمای اتاق انکوبه کرده و برای بار دوم جذب نوری نمونه‌ها را در طول موج 340 نانومتر قرائت و یادداشت کنید.

5)رسم منحنی استاندارد:

بدین منظور جذب نوری غلظت‌های مختلف NADPH (استاندارد) را پس از طی مرحله 4 (مرحله قبلی) در دقیقه صفر قرائت کرده و جذب نوری استاندارد با غلظت صفر در زمان صفر را از آن کسر کنید و با اعداد به دست آمده منحنی استاندارد را در نرم‌افزارهای آماری ترسیم کنید. در غلظت های بالای NADPH گاهاً افزایش OD را شاهد هستیم که توصیه می‌شود نمودار را با غلظت های 20 تا 60 نانومول از NADPH رسم کنید تا فرمول خط با ضریب رگرسیون مناسب به دست آید.



6) محاسبات:

بر اساس غلظت‌ها و مقادیر جذب نوری به‌دست آمده در مراحل ۳ و ۴، عددها را در محل مناسب در فرمول قرار داده و درنهایت مقدار فعالیت GPx را برای هر نمونه به‌دست آورید.

$$\Delta A\ 340\ nm = (S1 - S2) - (A1 - A2)$$

S1: *جذب نوری نمونه مورد نظر در زمان صفر*

S2: *جذب نوری نمونه مورد نظر در زمان دوم*

A1: *جذب نوری استاندارد با غلظت صفر در زمان صفر*

A2: *جذب نوری استاندارد با غلظت صفر در زمان دوم*

در این مرحله، از منحنی به دست آمده در مرحله ۵، جهت تعیین مقدار **NADPH** طبق فرمول زیر استفاده کنید. مقادیر B در این فرمول برای محاسبه میزان فعالیت GPx مورد استفاده خواهد شد:

$$B = \left(\frac{\Delta A340\ nm - \text{عرض از مبدا}}{\text{شیب خط}}\right)$$

حال میزان فعالیت گلوتاتیون پراکسیدار طبق فرمول زیر محاسبه می‌شود:

$$GPx\ Activity = \frac{B}{\text{مقدار نمونه} \times (\text{زمان اول قرائت جذب نوری} - \text{زمان دوم قرائت جذب نوری})} \times \text{رقت}$$

Navand Lab Kit
تلفن تماس: ۰۹۰۱۴۱۱۴۰۹۷ وبسایت: www.navandsalamat.com ایمیل: navandsalamat@gmail.com
آدرس: ارومیه، کیلومتر ۱۱ جاده سرو، پارک علم فناوری آذربایجان غربی، شرکت نوند سلامت - کدپستی: ۵۷۵۶۱۱۵۳۲۳

میزان فعالیت آنزیم گلوتاتیون پراکسیداز به‌دست آمده از طریق فرمول بالا، بر حسب واحدهای *nmol/min/ml* یا *mU/mL* گزارش می‌شود.

توصیه‌های نوند سلامت:

- ✓ برای به‌دست آوردن نتایج دقیق‌تر بهتر است ابتدا میزان پروتئین موجود در نمونه‌های خود را با کیت سنجش پروتئین با کد محصول ۱۵۰۷۲ بسنجید و نتایج را بر اساس میزان فعالیت آنزیم در هر میلی‌گرم پروتئین گزارش کنید.
- ✓ برای به‌دست آوردن نتایج دقیق‌تر بهتر است قبل از افزودن **R2**، جذب نوری نمونه‌ها را در ۳۴۰ نانومتر اندازه بگیرید. اگر OD در 340 نانومتر کمتر از ۱/۰ باشد، می‌توانید با اضافه کردن محلول استاندارد به چاهک، جذب نوری را به بالای ۱ برسانید. توجه داشته باشید که افزودن هر میلی‌لیتر از محلول استاندارد به‌صورت تقریبی ۰/۵ واحد به OD اضافه خواهد کرد.
- ✓ به زمان‌ها و شرایط نگهداری مواد ذکر شده در پروتکل و روی جعبه توجه کنید.
- ✓ پوشش محافظتی مناسب و ایمن را در انجام مراحل آزمایش رعایت کنید.

عیب یابی:

مشکل	احتمالات موجود	راه حل های پیشنهادی
عدم کارکرد سنجش یا آزمایش	عدم رعایت ترتیب مراحل آزمایش	به پروتکل موجود مراجعه کرده و دقیقا پیروی نمایید
	پلیت ریدردرطول موج نادرست	تنظیمات فیلتر دستگاه را چک نمایید
نمونه‌ها با قرائت (خوانش) نامنظم یا نامعقول	نمونه ها در بافرهای متفاوتی تهیه شده باشند	از بافر موجود در کیت استفاده نموده و یا به دستورالعمل موجود در پروتکل مراجعه نمایید
	استفاده ازنمونه های چند بار دفریز شده	اگر نمونه ها چندین بار مورد استفاده قرار خواهند گرفت آن‌های را به دو یا سه قسمت تقسیم نمایید
	وجود حباب در چاهک	از بین بردن حباب‌هلی چاهک با ضربه زدن آرام به کنار پلیت
	استفاده از کیت منقضی شده و یا نگهداری نامناسب معرف‌ها	تاریخ انقضای کیت را چک نموده و معرف ها را در شرایط مناسب نگهداری نمایید
	زمان و درجه حرارت نامناسب انکوباسیون	به پروتکل مراجعه کنید و زمان و دمای مناسب انکوباسیون را بررسی نمایید
	استفاده از حجم‌های نامناسب	از سمپلر کالیبره شده استفاده نموده و مواد را تقسیم نمایید
منحنی استاندارد غیر خطی	یکی از محلول‌ها به چاهک اضافه نشده است	اطمینان حاصل کنید که تمامی محلول‌ها را به چاهک اضافه کرده‌اید
	خطاهای مرتبط با پیپت کردن در آماده سازی محلول‌های استاندارد	از حجم های بالا استفاده نمایید
	خطاهای پیپت کردن در محلول واکنش	محلول کار را هر زمان که ممکن است حاضر نمایید
	تشکیل حباب های هوا در چاهک‌ها	محتویات پیپت را به آرامی در چاهک ها خالی نمایید
	خطاهای محاسبات	بعد مراجعه به پروتکل ، محاسبات را دوباره انجام دهید
نتایج غیر منتظره	نمونه ها در طول موج نادرست خوانده شوند	تنظیمات فیلتر و دستگاه را بررسی نمایید
	نمونه ها دارای محتویات مداخله گر باشند	در صورت امکان نمونه را بیشتر رقیق نمایید
	خواندن نمونه در بالا / زیر محدوده خطی	نمونه های غلیظ یا رقیق کرده تا خوانایی در محدوده خطی باشند
	فعالیت آنریم بسیار پایین است	غلظت نمونه را با استفاده از Avaporator افزایش دهید

عدم کاهش جذب نوری در نمونه‌ها	Reagent 2 به نمونه‌ها اضافه نشده است	از افزودن تمامی محلول‌ها اطمینان حاصل کنید
سرعت واکنش بسیار بالاست	غلظت آنزیم درون چاهک بسیار زیاد است	نمونه‌ها را با بافر رقیق نمایید