

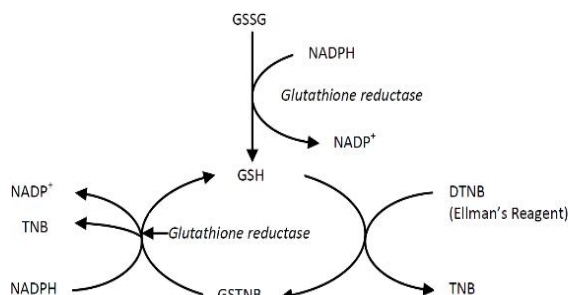


کیت سنجش گلوتاتیون (احیا)

NarGul™ Reduced Glutathione (GSH) Assay Kit

مقدمه:

گلوتاتیون یک تیول تری‌پپتید کلیدی داخل سلولی بوده که از اسید گلوتامیک، سیستئین و گلیسین تشکیل شده است. گلوتاتیون با محافظت از سلول‌ها در برابر آسیب رادیکال‌های آزاد به عنوان یک آنتی‌اکسیدان کمک می‌کند. گلوتاتیون در داخل سلول‌ها در حالت‌های کاهش GSH و اکسید شده GSSG وجود دارد. در سلول‌ها و بافت‌های سالم بیش از ۹۰ درصد کل گلوتاتیون در فرم کاهش یافته است در حالی که کمتر از ۱۰ درصد در فرم دی‌سولفید GSSG وجود دارد.



غلظت بالای GSH به این دلیل است که آنزیم گلوتاتیون ردوکتاز (که آن را از حالت اکسیداسیون انتقال می‌دهد)، بسیار فعال است. افزایش GSSG به GSH به عنوان نشان‌دهنده استرس اکسیداتیو است. کاهش تیول گروه گلوتاتیون، منجر به کاهش حالت‌های دیگر ROS می‌شود، که ناپایدار می‌باشد. این GSH ناپایدار به راحتی با یک GSH نامطلوب دیگر واکنش می‌دهد تا یک مولکول GSSG ثابت ایجاد کند. این واکنش شایع است زیرا گلوتاتیون در غلظت‌های بالا وجود دارد. GSSG پس از آن، توسط آنزیم گلوتاتیون ردوکتاز دوباره به GSH تبدیل می‌شود.

محتوای کیت:

ردیف	دمای نگهداری	نام ماده	تست ۴۸	تست ۹۶
۱	2-8 °C	GSH Buffer	۱۲ میلی‌لیتر	۱۳ میلی‌لیتر
۲	-20 °C	GSH Standard	۱ ویال	۱ ویال
۳	-20 °C	Cofactor	۲ ویال	۳ ویال
۴	-20 °C	GR Enzyme	۳ میلی‌لیتر	۶ میلی‌لیتر
۵	2-8 °C	DTNB	۱ ویال	۱ ویال
۶	2-8 °C	DTNB Reagent	۶ میلی‌لیتر	۶ میلی‌لیتر
۷	2-8 °C	Lysing Buffer	۵۰ میلی‌لیتر	۱۰۰ میلی‌لیتر
۸	-	96-Well plate	۱ عدد	۱ عدد

موارد مورد نیاز که در داخل کیت موجود نیست:

- میکروپلیت‌ریدر با قابلیت اندازه‌گیری جذب (OD) نوری ۴۱۲ نانومتر
- هموژنایزر؛ در صورت استفاده از بافت به عنوان نمونه (هموژنایزر نوند سلامت با کد محصول ۱۶۰۱۰)
- سانتریفیوژ
- آب دیونیزه استریل
- سرد PBS



مراحل انجام آزمایش:

۱) آماده‌سازی نمونه‌ها:

- **نمونه‌های بافتی:** نمونه بافتی را ابتدا با PBS سرد شست و شو دهید. در حدود ۵۰ تا ۱۰۰ میلی‌گرم از آن را وزن کرده و ۵۰۰ تا ۱۰۰۰ میکرولیتر، Lysing Buffer موجود در کیت را اضافه کنید. سپس توسط هموژنایزر شیشه‌ای (استفاده از هموژنایزر نوند سلامت با کد محصول ۱۶۰۱۰ پیشنهاد می‌گردد) نمونه مورد نظر را هموژنایز کرده و در ۹۰۰۰ دور به مدت ۱۵ دقیقه سانتریفیوژ کنید (نوند سلامت در این مرحله استفاده از سانتریفیوژ یخچال‌دار را توصیه می‌کند). در ادامه مایع رویی را جدا کرده و به عنوان نمونه استفاده نمایید.
- **نمونه‌های سلولی:** ابتدا تعداد 10^7 سلول را در ۹۰۰۰ دور به مدت ۱۰ دقیقه و دمای ۴ درجه سانتی‌گراد سانتریفیوژ کنید. سپس رسوب سلولی را با یک میلی‌لیتر Lysing Buffer هموژن کنید و پس از سانتریفیوژ در ۹۰۰۰ دور به مدت ۱۵ دقیقه، مایع رویی را جدا کرده و به عنوان نمونه استفاده نمایید.
- **نمونه‌های سرم، اریتروسیت:** نمونه خون بدون ماده ضد انعقاد را در ۵۰۰۰ دور به مدت ۱۰ دقیقه سانتریفیوژ کرده و مایع رویی را جداسازی و نمونه را تا زمان سنجش روی یخ نگهداری نمایید. جهت آماده‌سازی نمونه اریتروسیت، ابتدا نمونه خون کامل را سانتریفیوژ (۵۰۰۰ دور به مدت ۱۰ دقیقه) و پس از جداسازی پلاسما، اریتروسیت‌ها را با آب دیونیزه لیز نموده و سپس با دور ۹۰۰۰ به مدت ۱۵ دقیقه در ۴ درجه سانتی‌گراد سانتریفیوژ نمایید. مایع رویی را جمع‌آوری کرده و تا زمان سنجش روی یخ نگهداری کنید. ماندگاری نمونه‌های پلاسما و اریتروسیت در منفی ۸۰ درجه سانتی‌گراد، به مدت ۱ ماه می‌باشد.
- **توجه:** نمونه‌های سرم و اریتروسیت را بهتر است در هنگام شروع کار ۱ تا ۵ برابر رقیق کرده و در محاسبات ضرب رقت را وارد کنید.

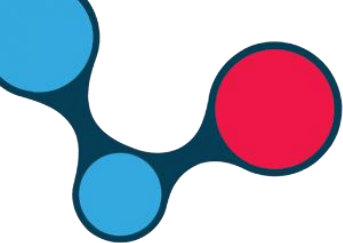
۲) آماده‌سازی معرف‌ها:

- **Cofactor:** مقدار ۲ میلی‌لیتر آب دیونیزه به ویال اضافه کرده و در زمان سنجش به دمای اتاق برسانید. ماندگاری محلول رقیق شده یک هفته در دمای ۲۰- درجه سانتی‌گراد می‌باشد.
- **DTNB:** ۶ میلی لیتر از Reagent DTNB را به ویال DTNB اضافه کنید. ماندگاری محلول حاصل یک هفته در دمای ۲۰- درجه سانتی‌گراد می‌باشد.
- **GSH Standard:** مقدار ۵ میلی‌لیتر GSH Buffer را به ویال استاندارد اضافه کنید تا استاندارد ۴ میلی مولار به دست بیاید. از محلول حاصل جهت رسم نمودار استاندارد استفاده کنید. ماندگاری محلول حاصل ۳ هفته در دمای ۲۰- درجه سانتی‌گراد است.

۳) محلول استاندارد:

غلظت نهایی استاندارد (میلی مولار)	GSH Buffer (میکرولیتر)	استاندارد ۴ میلی‌مولار (میکرولیتر)	لوله
۰	۱۰۰۰	۰	A
۱	۷۵۰	۲۵۰	B
۲	۵۰۰	۵۰۰	C
۳	۲۵۰	۷۵۰	D
۴	۰	۱۰۰۰	E

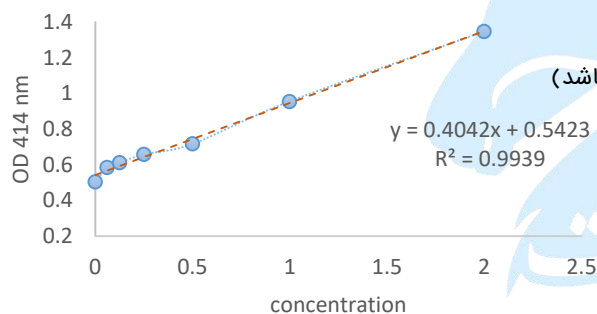
غلظت استاندارد تهیه شده ۴ میلی مولار می‌باشد و برای رسم منحنی استاندارد طبق جدول روبرو غلظت‌های مختلف را تهیه نمایید.



۴) روش کار:

- A. مقدار ۲۰ میکرولیتر GSH Buffer به ۲ چاهک ردیف A به عنوان بلانک اضافه کنید.
- B. مقدار ۲۰ میکرو لیتر از هر رقت استاندارد را به چاهک‌های ردیف B تا H پلیت اضافه کنید.
- C. مقدار ۲۰ میکرولیتر از نمونه را به چاهک‌های باقی مانده اضافه کنید.
- D. مقدار مساوی از محلول DTNB آماده شده و GR Enzyme را مخلوط کرده و مقدار ۱۲۰ میکرولیتر از محلول حاصل را به چاهک‌ها اضافه کنید (برای ۴۸ عدد نمونه مقدار ۳۰۰ میکرولیتر DTNB را با ۳۰۰ میکرولیتر GR Enzyme ترکیب کنید).
- نکته:** محلول حاصل از ترکیب آنزیم و DTNB را درون ورقه آلومینیومی و دور از نور نگهدارید.
- E. ۳۰ ثانیه پلیت را انکوبه کرده و سپس ۶۰ میکرولیتر محلول Cofactor به چاهک‌ها اضافه نمایید.
- F. بلافاصله جذب نوری پلیت را در طول موج ۴۱۲ نانومتر (۴۰۵ - ۴۲۰ نانومتر) قرائت نمایید.
- G. حداکثر زمان جهت خوانش جذب نوری ۵ دقیقه می‌باشد.

غلظت‌های



GSH assay

- **رسم منحنی استاندارد:** با استفاده از نرم‌افزارهای آماری همچون اکسل، نمودار منحنی استاندارد مختلف را به دست آورده و با توجه به فرمول خط مقدار گلووتاتیون (احیا) را محاسبه نمایید.

y: جذب نوری استاندارد

A: شیب خط (مثال در فرمول نمودار مقابل این عدد برابر با ۰/۴۰۴۲ می‌باشد)

x: غلظت استاندارد

B: عرض از مبدا (مثال در فرمول نمودار مقابل این عدد برابر با ۰/۵۴۲۳ می‌باشد)

می‌باشد)

۴) محاسبه:

مقدار GSH هر نمونه با توجه به منحنی استاندارد از فرمول زیر محاسبه می‌شود:

$$\text{ضریب رقت} \times \left(\frac{\text{عرض از مبدا} - \text{جذب نوری نمونه در } 414 \text{ نانومتر}}{\text{شیب خط}} \right)$$

واحد اندازه‌گیری GSH در این کیت به میکرومولار است



۵) توصیه‌ها:

- برای به دست 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.
- به زمان‌ها و شرایط نگهداری مواد ذکر شده در پروتکل و روی جعبه توجه کنید.
- مقدار نهایی محلول سنجش درون هر چاهک ۲۰۰ میکرولیتر می‌باشد.
- ضروری است که تمامی چاهک‌های پلیت در یک زمان مورد سنجش قرار بگیرند.
- اضافه کردن محلول کار به نمونه‌ها باید در کمترین زمان ممکن صورت بگیرد.
- ممکن است یک پژوهشگر نتایج متفاوت از آزمایش مشابه به دست بیاورد. به منظور بهتر شدن نتایج، توصیه می‌شود از هر نمونه دوبار تکرار انجام گرفته و میانگین آن‌ها را به عنوان نتیجه نهایی گزارش کنید.
- قبل از شروع آزمایش، از کافی بودن مقدار نمونه‌ها و محلول‌ها اطمینان حاصل کنید.
- کیت‌های مختلف ممکن است حساسیت، محدوده تشخیص و روش کار متفاوتی داشته باشند، لذا آزمایش را دقیقاً طبق روش کار مندرج در این پروتکل انجام دهید.
- محلول و مواد دیگر را جایگزین محلول و مواد داخل کیت نکرده و تنها از مواد موجود در کیت استفاده کنید.
- پس از شروع آزمایش، تمام مراحل باید بدون وقفه، کامل شود. اطمینان حاصل کنید که همه معرف‌ها، مواد و دستگاه‌ها در زمان مناسب آماده می‌شوند.
- زمان انکوباسیون نتایج را تحت تأثیر قرار خواهد داد لذا همه چاهک‌ها باید در همان ترتیب و زمان، مورد استفاده قرار گیرند.
- در زمان کار با کیت رعایت اصول ایمنی آزمایشگاهی الزامی می‌باشد.

۶) عیب‌یابی:

مشکل	احتمالات موجود	راه حل‌های پیشنهادی
عدم کارکرد سنجش یا آزمایش	برداشتن مقدار نادرست مواد	دقت در اندازه گیری
	وجود حباب در سرمپلر	جلوگیری از ایجاد حباب در سرمپلر
عدم وجود طیف رنگی استاندارد	عدم اضافه کردن یک یا چند محلول به محلول کار	اطمینان از اضافه کردن تمامی محلول‌ها
	عدم اضافه کردن استاندارد به چاهک‌ها	اطمینان از اضافه کردن صحیح استاندارد
منحنی استاندارد غیر خطی	یکی از محلول‌ها به چاهک اضافه نشده است	اطمینان حاصل کنید که تمامی محلول‌ها را به چاهک اضافه کرده‌اید
	تشکیل حباب‌های هوا در چاهک‌ها	محتویات پیپت را به آرامی در چاهک‌ها خالی نمایید
	مقدار بالای جذب در مقادیر زیاد GSH	خوانش جذب در زمان‌های کمتر
	بازه اعداد نادرست برای نمودار استاندارد	بالاترین مقدار جذب استاندارد باید کمتر از ۱/۲ باشد
عدم ایجاد رنگ در نمونه‌ها	خطاهای محاسبات	بعد مراجعه به پروتکل، محاسبات را دوباره انجام دهید
	مقدار GSH در نمونه‌ها بسیار کم است	افزایش غلظت نمونه توسط لیوفیلیز کردن
مقدار جذب نمونه بیشتر از جذب نوری بالاترین استاندارد	مقدار GSH در نمونه‌ها کم است	حل کردن نمونه در مقدار کمتر GSH Buffer
	غلظت بالای نمونه	رقیق کردن نمونه

- در صورتی که در انجام هر یک از مراحل آزمایش دچار ابهام، مشکل یا اشتباه شده‌اید، نگران نباشید، تیم پشتیبانی فنی نوند سلامت در کنار شماست. کافی است به شماره تلفن ۰۹۱۴۱۴۰۹۷ از طریق واتساپ/تلگرام پیام دهید. کارشناسان ما برای رفع مشکل با شما تماس خواهند گرفت.
- نظرات و پیشنهادات مشتریان، همواره پله‌های پیشرفت و بهبود کیفیت را در نوند سلامت تشکیل می‌دهند. لذا در صورت وجود هرگونه نظر، انتقاد یا پیشنهاد، لطفاً آن را از طریق ایمیل hi@navandsalamat.com با ما در میان بگذارید.