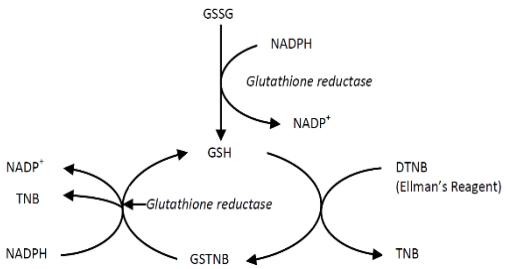
کیت سنجش گلوتاتیون (اکسید شده)

NagluT™ Oxidized Glutathione (GSSG) Assay Kit

مقدمه:

گلوتاتیون، یک تیول تری‌پپتید کلیدی داخل سلولی است که از اسید گلوتامیک، سیستئین و گلایسین تشکیل شده است. گلوتاتیون با محافظت از سلول‌ها در برابر آسیب رادیکال‌های آزاد به عنوان یک آنتی‌اکسیدان عمل 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 دی سولفید (اکسید شده) GSSG وجود دارد. بالا بودن سهم GSH نسبت به GSSG به این دلیل است که آنزیم گلوتاتیون ردوکتاز (که آن را از حالت اکسیداسیون انتقال می‌دهد)، بسیار فعال است. افزایش سهم GSSG به GSH به عنوان نشان دهنده استرس اکسیداتیو است. کاهش تیول گروه گلوتاتیون، منجر به کاهش حالت‌های دیگر ROS می‌شود، که ناپایدار است. 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	۴۸ تست	۹۶ تست
۱	2-8 °C	**GSSG Buffer 2X**	۴ میلی‌لیتر	۸ میلی‌لیتر
۲	-20 °C	**Standard**	۱ ویال	۱ ویال
۳	-20 °C	**Cofactor**	۱ ویال	۱ ویال
۴	-20 °C	**Enzyme**	۱/۵ میلی‌لیتر	۲/۵ میلی‌لیتر
۵	2-8 °C	**DTNB**	۱ ویال	۱ ویال
۶	2-8 °C	**DTNB Reagent**	۴ میلی‌لیتر	۴ 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 ۴۰۵ نانومتر
- هموژنایزر، در صورت استفاده از بافت به عنوان نمونه (هموژنایزر نوند سلامت با کد محصول ۱۶۰۱۰)
- سانتریفیوژ، با حداقل دور ۸۰۰۰ دور در دقیقه
- آب دیونیزه استریل
- میکروتیوب

Copyright © 2022 Navand Salamat. All rights reserved

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 ۱۰ برابر وزن آن در واحد میکرو (۵۰۰ تا ۱۰۰۰ میکرولیتر) ، Lysing Buffer موجود در کیت را اضافه کنید. سپس توسط هموژنایزر شیشه‌ایی (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 نمائید.
- **نمونه‌های سلولی**: ابتدا تعداد 10^7 سلول را در ۹۰۰۰ دور به مدت ۱۰ دقیقه و دمای ۴ درجه سانتی گراد 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 نمائید.
- **نمونه‌های پلاسما، اریتروسیت:** ابتدا نمونه را در دور ۸۰۰۰ به مدت ۱۰ دقیقه و دمای ۴ درجه سانتی‌گراد سانتریفیوژ کرده و مایع رویی زرد رنگ را جمع‌آوری نمایید. نمونه پلاسما را تا زمان سنجش روی یخ نگهداری نمایید. جهت آماده‌سازی نمونه اریتروسیت، ابتدا 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.

۲) آماده‌سازی معرف‌ها:

- **GSSG Buffer 2X**: جهت آماده‌سازی محلول با مقدار مساوی آب دیونیزه رقیق نمایید (توجه داشته باشید که pH بافر در هنگام استفاده برابر با ۶ باشد).
- **Cofactor**: مقدار ۲ میلی‌لیتر آب دیونیزه به ویال اضافه کرده و در زمان سنجش به دمای اتاق برسانید. پس از آماده‌سازی از فویل آلومینیومی جهت پوشش دادن ویال استفاده گردد. ماندگاری محلول رقیق شده، ۲ هفته در دمای ۴ درجه سانتی‌گراد می‌باشد.
- **Standard:** ۶۰۰ میکرولیتر آب مقطر را به ویال استاندارد (حاوی پودر) اضافه نمایید. دقت فرمایید که بطور کامل پودر حل شود.
- **DTNB**: ۴ میلی لیتر از Reagent DTNB را به ویال DTNB اضافه کنید. ماندگاری محلول حاصل یک هفته در دمای ۴ درجه سانتی‌گراد می‌باشد.

۳) محلول استاندارد:

ابتدا در میکروتیوب‌های جداگانه رقت‌های مختلف محلول استاندارد را با استفاده از جدول تهیه کنید. از این میکروتیوب‌ها در مرحله ۴ به عنوان نمونه استفاده خواهید کرد. پس از انجام مراحل قرائت جذب نوری برای رسم منحنی استاندارد از آن استفاده نمائید.

نکته: توصیه می‌شود قبل از شروع آزمایش نمودار استاندارد را بر اساس **روش کار** رسم کنید و در صورتی که جذب نوری استاندارد بیشتر از ۱/۵ باشد، از ۴۵ میکرولیتر DTNB (به جای ۹۰ میکرولیتر DTNB در روش کار) در محلول کار استفاده نمایید.

لوله (چاهک)	Standard Solution (میکرولیتر)	GSSG Buffer (میکرولیتر)	غلظت نهایی استاندارد (uM)
A	۰	۵۰۰	۰
B	۵	۴۹۵	۰/۲۵
C	۱۰	۴۹۰	۰/۵
D	۲۰	۴۸۰	۱/۰
E	۴۰	۴۶۰	۲/۰

Copyright © 2022 Navand Salamat. All rights reserved

۴) روش کار:

A. مقدار ۲۵ میکرولیتر از محلول استاندارد آماده شده در میکروتیوب را به هر چاهک اضافه کنید (توصیه می‌شود دو ستون از میکروپلیت را بصورت ۲ تکرار برای هر غلظت استاندارد در نظر بگیرید).

B. مقدار ۲۵ میکرولیتر نمونه را به چاهک‌های باقی مانده اضافه کنید.

C. مقدار ۲۵ میکرولیتر آب دیونیزه به تمامی چاهک‌های حاوی استاندارد و نمونه اضافه کنید.

D. برای انجام هر ۲۲ تست، محلول کار را بلافاصله قبل از اضافه کردن به چاهک‌ها به ترتیب زیر آماده کنید:

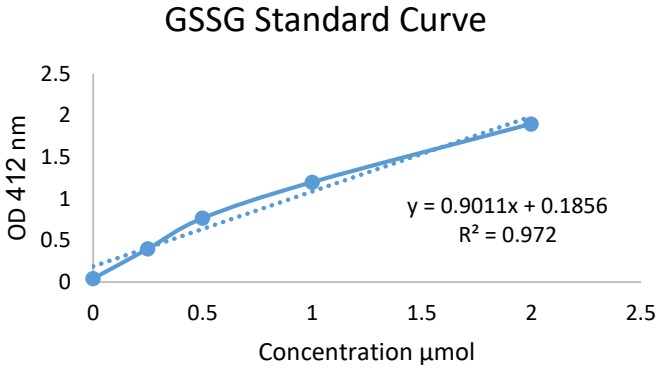
۲/۲۵ میلی‌لیتر GSSG Buffer، ۹۰ میکرولیتر Cofactor، ۴۲۰ میکرولیتر Enzyme، ۴۶۰ میکرولیتر آب دیونیزه و ۹۰ میکرولیتر DTNB را مخلوط کنید. توجه داشته باشد که این مقادیر مواد برای ۲۲ تست کافی بوده و در صورت سنجش تعداد نمونه کمتر یا بیشتر، مقادیر مواد را با نسبت مساوی تغییر دهید (مثال: برای ۴۴ نمونه باید مقادیر فوق را دو برابر کنید).

E. مقدار ۱۵۰ میکرولیتر از محلول کار را به تمامی چاهک‌های حاوی استاندارد و نمونه اضافه کنید.

F. جذب نوری چاهک‌های میکروپلیت را در طول موج ۴۱۲ (۴۰۰ تا ۴۲۰) نانومتر قرائت نمایید.

نکته: حداکثر زمان مجاز جهت خوانش جذب نوری ۵ دقیقه بعد از آماده‌سازی می‌باشد.

- رسم منحنی استاندارد: با استفاده از نرم‌افزارهای آماری همچون اکسل، نمودار منحنی استاندارد غلظت‌های مختلف را به دست آورده و با توجه به فرمول خط مقدار گلوتاتیون را محاسبه نمائید.



y: جذب نوری استاندارد

A: شیب خط (مثال در فرمول نمودار مقابل این عدد برابر با ۰/۹۰۱۱ می‌باشد)

x: غلظت استاندارد

B: عرض از مبدا (مثال در فرمول نمودار مقابل این عدد برابر با ۰/۱۸۵۶ می‌باشد)

۵) محاسبه:

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

$$\text{ضریب رقت} \times \left(\frac{\text{عرض از مبدا} - \text{جذب نوری نمونه در ۴۱۲ نانومتر}}{\text{شیب خط}}\right)$$

نکته: تمامی اعداد به دست آمده در نهایت ضربدر ۲ خواهند شد تا مقدار نهایی GSSG به دست آید (واحد اندازه‌گیری GSSG در این کیت به میکرومولار است).

Copyright © 2022 Navand Salamat. All rights reserved

۶) توصیه‌ها:

- 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.
- 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 دقیقا 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 اندازه‌گیری
	وجود حباب در سرسمپلر	جلوگیری از ایجاد حباب در سرسمپلر
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
	خطاهای مرتبط با پیپت کردن در آماده‌سازی محلول‌های استاندارد	از حجم‌های 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
	GSSG مقدار بالای جذب در مقادیر زیاد	خوانش جذب در زمان‌های کمتر
	بازه اعداد نادرست برای نمودار استاندارد	بالاترین مقدار جذب استاندارد باید کمتر از ۱/۲ باشد
	خطاهای محاسبات	بعد مراجعه به پروتکل ، محاسبات را دوباره انجام دهید
عدم ایجاد رنگ در نمونه‌ها	مقدار GSSG در نمونه‌ها بسیار کم است	افزایش غلظت نمونه توسط لیوفیلیز کردن
	مقدار GSSG در نمونه ها کم است	حل کردن نمونه در مقدار کمتر GSSG Buffer
مقدار جذب نمونه بیشتر از جذب نوری بالاترین استاندارد	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 ۰۹۰۱۴۱۱۴۰۹۷ 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، لطفا آن را از طریق ایمیل hi@navandsalamat.com با ما در میان بگذارید.

Copyright © 2022 Navand Salamat. All rights reserved