



کیت سنجش فعالیت آنزیم گلوکوتاتیون پراکسیداز Nagpix™ Glutathione Peroxidase (GPx) Activity Assay Kit

مقدمه:

آنزیم گلوکوتاتیون پراکسیداز (GPx) آنزیمی است که در بخش‌های سیتوپلاسمی و میتوکندری سلول یافت می‌شود. گلوکوتاتیون پراکسیدازها، گروهی از آنزیم‌ها هستند که در حفاظت از ارگانیسم‌ها در برابر آسیب اکسیداتیو نقش مهمی دارند. این آنزیم، گلوکوتاتیون کاهشی (GSH) را به گلوکوتاتیون 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 گلوکوتاتیون پراکسیداز باعث کاهش هیدروپراکسیدکومن در هنگام اکسیداسیون GSH به GSSG می‌شود و در ادامه GSSG با مصرف NADPH توسط آنزیم گلوکوتاتیون ردوکتاز به GSH کاهش می‌یابد. در این واکنش، NADPH مصرف شده به‌عنوان یک مارکر تعیین مقدار GPx در نظر گرفته می‌شود و در طول موج ۳۴۰ نانومتر میزان فعالیت GPx را تعیین می‌کند. این سنجش برای اندازه‌گیری تمام پراکسیدازهای وابسته به گلوکوتاتیون در پلاسما، لیفات اریتروسیت، هموگلوبین و لیفات سلولی با حساسیت ۰/۵ mU/ml کاربرد دارد.

محتوای کیت:

ردیف	دمای نگهداری	نام ماده	تست ۴۸	تست ۹۶
۱	-20 °C	Reagent 1	۲ ویال	۴ ویال
۲	2-8 °C	Reagent 2	۷۰۰ میکرولیتر	۱۵۰۰ میکرولیتر
۳	-20 °C	Standard solution	۱ ویال	۱ ویال
۴	2-8 °C	Assay Buffer	۱۲/۵ میلی‌لیتر	۲۵ میلی‌لیتر
۵	RT	96-Well plate	۱ عدد	۱ عدد

موارد مورد نیاز که در داخل کیت موجود نیست:

- میکروپلیت ریدر با قابلیت خوانش ۳۴۰ نانومتر
- PBS (برای نمونه‌های بافتی)
- هموژنایزر شیشه‌ای (در صورت استفاده از بافت به عنوان نمونه)
- سانتریفیوژ

مراحل انجام آزمایش:

۱) 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:

- مقدار ۱۰۰ میلی گرم بافت و یا ۲×۱۰^۶ سلول مورد نیاز برای هر آزمایش را برداشته و با PBS سرد شست و شو دهید.
- 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 ۱۶۰۱۰ استفاده کنید).
- محلول را ۱۵ دقیقه در دمای ۴ درجه سانتی‌گراد در ۹۰۰۰ دور سانتریفیوژ کنید.



D. 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:**

A. گلبول‌های قرمز جدا شده را با نسبت ۱:۱ با Assay Buffer سرد، مخلوط و هموژن کنید. سپس به مدت ۱۵ دقیقه در دمای ۴ درجه سانتی‌گراد در ۹۰۰۰ دور سانتریفیوژ کنید.

B. محلول رویی را جدا و به عنوان نمونه از آن استفاده نمایید.

- **سرم و پلاسما:**

نمونه‌های 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 ۸۰- درجه سانتی‌گراد نگهداری کرد).

۲) آماده سازی محلول کار:

- **Reagent 1:** به هر تیوب حاوی پودر 1 Reagent مقدار یک میلی‌لیتر Assay Buffer اضافه نمایید. هر تیوب R1 پس از افزودن Assay Buffer برای ۲۵ تست کافی است و در دمای ۲۰- درجه سانتی‌گراد به مدت یک ماه قابل نگهداری است.

- **محلول استاندارد:** به هر تیوب Standard مقدار ۱ میلی‌لیتر آب دیونیزه اضافه نموده و از این محلول به عنوان استاندارد جهت رسم منحنی استفاده کنید. محلول استاندارد آماده شده، دارای غلظت یک میلی‌مولار از NADPH است و در دمای ۲۰- درجه سانتی‌گراد به مدت یک ماه قابل نگهداری است.

۳) تهیه محلول استاندارد:

ابتدا رقت‌های مختلف محلول استاندارد را با استفاده از جدول مقابل تهیه کرده و برای رسم منحنی استاندارد از آن استفاده نمایید.

۴) روش کار:

الف) ابتدا ۵۰ میکرولیتر از نمونه یا استاندارد آماده شده را در چاهک‌های پلیت ۹۶ 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، ۴۰ میکرولیتر R1 آماده شده را اضافه کرده و سپس به مدت ۱۵ دقیقه در دمای اتاق انکوبه کنید.

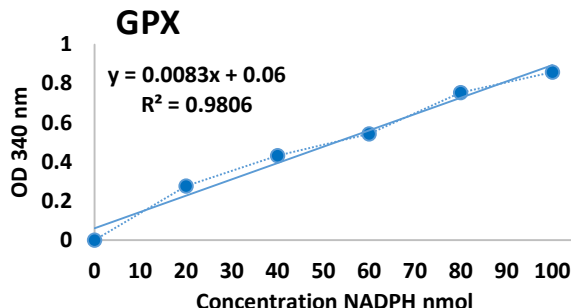
ب) برای شروع واکنش، ۱۰ میکرولیتر از R2 را اضافه کرده و خوب

مخلوط کنید. جذب نوری نمونه‌ها / استاندارد را در طول موج ۳۴۰ نانومتر قرائت و یادداشت کنید (زمان صفر).

ج) به مدت ۵ تا ۱۰ دقیقه در دمای اتاق انکوبه کرده و برای بار دوم جذب نوری نمونه‌ها و استاندارد چاهک ردیف A را در طول موج ۳۴۰ نانومتر قرائت و یادداشت کنید (زمان دوم).

- **رسم منحنی استاندارد:** بدین منظور جذب نوری غلظت‌های مختلف استاندارد را پس از طی مرحله ۴ (مرحله قبلی) در دقیقه صفر قرائت می‌کنیم. سپس طبق فرمول زیر عمل می‌کنیم. توجه کنید که جهت رسم نمودار تنها از جذب نوری در زمان صفر استفاده می‌کنیم.

جذب استاندارد غلظت صفر – جذب استاندارد در غلظت‌های مختلف = OD standard 340 nm



فرمول خط حاصل از نمودار مقابل به شکل زیر می‌باشد:

$$y = Ax + B$$

Y: جذب نوری استاندارد

A: شیب خط (مثال در فرمول نمودار مقابل این عدد برابر با ۰/۰۰۸۳ می‌باشد)

X: غلظت NADPH

B: عرض از مبدا (مثال در فرمول نمودار مقابل این عدد برابر با ۰/۰۶ می‌باشد)

اعداد به دست آمده منحنی استاندارد را در نرم‌افزارهای آماری ترسیم کنید. در غلظت‌های بالای NADPH گاهی افزایش OD را شاهد هستیم که توصیه می‌شود نمودار را با غلظت‌های ۲۰ تا ۶۰ نانومول از NADPH رسم کنید تا فرمول خط با ضریب رگرسیون مناسب به دست آید.

(۵) محاسبه:

بر اساس غلظت‌ها و مقادیر جذب نوری به دست آمده در مراحل قبل، عددها را در محل مناسب در فرمول قرار داده و در نهایت مقدار فعالیت GPx را برای هر نمونه به دست آورید.

توجه: عدد حاصل از جذب نوری استاندارد چاهک ردیف A (بلانک) در زمان صفر و زمان دوم در این فرمول جاگذاری می‌شود.

$$\Delta A_{340 \text{ nm}} = (S1 - S2) - (A1 - A2)$$

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 ۴، جهت تعیین مقدار NADPH طبق فرمول زیر استفاده کنید. مقادیر B در این فرمول برای محاسبه میزان فعالیت GPx مورد استفاده خواهد شد:

$$B = \left(\frac{\Delta A_{340 \text{ nm}} - \text{عرض از مبدا}}{\text{شیب خط}} \right)$$

حال میزان فعالیت گلوکاتاتیون پراکسیداز طبق فرمول زیر محاسبه می‌شود (واحد مقدار نمونه، میکرولیتر می‌باشد):

$$\text{GPx Activity} = \frac{B}{\left(\text{زمان اول قرائت جذب نوری} - \text{زمان دوم قرائت جذب نوری} \right)} \times \text{وقت}$$

میزان فعالیت آنزیم گلوکاتاتیون پراکسیداز به دست آمده از طریق فرمول بالا، بر حسب واحدهای nmol/min/ml یا mU/mL گزارش می‌شود.



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.
- برای به‌دست آوردن نتایج دقیق‌تر بهتر است قبل از افزودن R2، جذب نوری نمونه‌ها را در ۳۴۰ نانومتر اندازه بگیرید. اگر OD در ۳۴۰ 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 ۵/۰ واحد به OD اضافه خواهد کرد.
- به زمان‌ها و شرایط نگهداری مواد ذکر شده در پروتکل و روی جعبه توجه کنید.
- 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.

۷) عیب‌یابی:

مشکل	احتمالات موجود	راه حل‌های پیشنهادی
عدم کارکرد سنجش یا آزمایش	عدم رعایت ترتیب مراحل آزمایش پلیت ریدر در طول موج نادرست	به پروتکل موجود مراجعه کرده و دقیقاً پیروی نمایید تنظیمات فیلتر دستگاه را چک نمایید
نمونه‌ها با قرائت (خوانش) نامنظم یا نامعقول	نمونه‌ها در بافرهای متفاوتی تهیه شده باشند استفاده از نمونه‌های چند بار دفریز شده وجود حباب در چاهک استفاده از کیت منقضی شده و یا نگهداری نامناسب معرف‌ها زمان و درجه حرارت نامناسب انکوباسیون استفاده از حجم‌های نامناسب	از بافر موجود در کیت استفاده نموده و یا به دستورالعمل موجود در پروتکل مراجعه نمایید اگر نمونه‌ها چندین بار مورد استفاده قرار خواهند گرفت آن‌ها را به دو یا سه قسمت تقسیم نمایید از بین بردن حباب‌های چاهک با ضربه زدن آرام به کنار پلیت تاریخ انقضای کیت را چک نموده و معرف‌ها را در شرایط مناسب نگهداری نمایید به پروتکل مراجعه کنید و زمان و دمای مناسب انکوباسیون را بررسی نمایید از سمپلر کالیبره شده استفاده نموده و مواد را تقسیم نمایید
منحنی استاندارد غیر خطی	یکی از محلول‌ها به چاهک اضافه نشده است خطاهای مرتبط با پیمت کردن در آماده سازی محلول‌های استاندارد خطاهای پیمت کردن در محلول واکنش تشکیل حباب های هوا در چاهک‌ها خطاهای محاسبات	اطمینان حاصل کنید که تمامی محلول‌ها را به چاهک اضافه کرده‌اید از حجم های بالا استفاده نمایید محلول کار را هر زمان که ممکن است حاضر نمایید محتویات پیمت را به آرامی در چاهک ها خالی نمایید بعد مراجعه به پروتکل ، محاسبات را دوباره انجام دهید
نتایج غیر منتظره	نمونه‌ها در طول موج نادرست خوانده شوند نمونه‌ها دارای محتویات مداخله گر باشند خواندن نمونه در بالا / زیر محدوده خطی	تنظیمات فیلتر و دستگاه را بررسی نمایید در صورت امکان نمونه را بیشتر رقیق نمایید نمونه های غلیظ یا رقیق کرده تا خوانایی در محدوده خطی باشند
عدم کاهش جذب نوری در نمونه‌ها	فعالیت آنزیم بسیار پایین است Reagent 2 به نمونه‌ها اضافه نشده است	غلظت نمونه را با استفاده از Evaporator افزایش دهید از افزودن تمامی محلول‌ها اطمینان حاصل کنید
سرعت واکنش بسیار بالاست	غلظت آنزیم درون چاهک بسیار زیاد است	نمونه‌ها را با بافر رقیق نمایید

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، لطفاً آن را از طریق ایمیل hi@navandsalamat.com با ما در میان بگذارید.