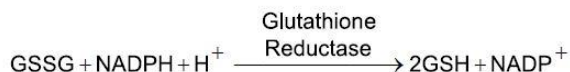




## کیت سنجش فعالیت آنزیم گلوتاتیون ردوکتاز NagluR™ Glutathione Reductase (GR) Activity Assay Kit

### مقدمه:

گلوتاتیون ردوکتاز (GR) آنزیمی است که واکنش کاهش گلوتاتیون در فرم دی سولفید را به گلوتاتیون در فرم سولفیدریل، کاتالیز می‌کند. این آنزیم، یک مولکول حیاتی در حفظ محیط کشت سلولی و مقاومت در برابر استرس اکسیداتیو است. همچنین با کمک به حفظ گلوتاتیون کاهش یافته درون سلولی، اثر غیرمستقیم در جلوگیری از آسیب اکسیداتیو داشته و اندازه‌گیری آن می‌تواند نشانگری برای استرس اکسیداتیو در سلول باشد. گلوتاتیون ردوکتاز باعث کاتالیز گلوتاتیون اکسیدشده (GSSG) به گلوتاتیون (GSH) می‌شود که این واکنش وابسته به NADPH است. گلوتاتیون اکسیدشده، از طریق یک واکنش چند مرحله‌ای تولید می‌شود که در آن گلوتاتیون ردوکتاز توسط NADPH کاهش یافته و با یک مولکول GSSG واکنش می‌دهد. در این واکنش دو مولکول GSH ایجاد می‌شود که گلوتاتیون ردوکتاز را به شکل اکسیدشده باز می‌گرداند. این مولکول در بدن در فرآیندهای کاهش اکسیداسیون و همچنین سم‌زدایی از پراکسید هیدروژن و پراکسیدهای آلی که توسط التهاب در سلول‌ها به وجود می‌آید، نقش دارد.



### محتوای کیت:

ردیف	دمای نگهداری	نام ماده	تست ۴۸	تست ۹۶
۱	-۲۰°C	GSSG	۱ ویال	۲ ویال
۲	-۲۰ °C	NADPH	۱ ویال	۲ ویال
۳	۲-۸ °C	Assay Buffer	۷ میلی‌لیتر	۱۵ میلی‌لیتر
۴	۲-۸ °C	Sample Buffer	۵۰ میلی‌لیتر	۱۰۰ میلی‌لیتر
۵	۲-۸ °C	NADPH Reagent	۱ میلی‌لیتر	۲ میلی‌لیتر
۶	-	96-Well plate	۱ عدد	۱ عدد

### موارد مورد نیاز که در داخل کیت موجود نیست:

- میکروپلیت‌ریدر با قابلیت اندازه‌گیری جذب (OD) ۳۴۰ نانومتر
- هموژنایزر شیشه‌ای (در صورت استفاده از بافت به عنوان نمونه)
- فسفات بافر (در صورت استفاده از بافت به عنوان نمونه)
- سانتریفوژ یخچالدار
- آب دیونیزه

### مراحل انجام آزمایش:

#### ۱) آماده‌سازی محلول کار:

- **GSSG:** مقدار ۸۰۰ میکرولیتر از آب دیونیزه را به ویال حاوی GSSG اضافه کنید.
- **NADPH:** مقدار ۸۰۰ میکرولیتر از **NADPH Reagent** را به ویال حاوی پودر NADPH اضافه کنید. ماندگاری محلول حاصل ۴ هفته در دمای منفی ۲۰ درجه سانتی‌گراد می‌باشد. برای استفاده توجه داشته باشید که NADPH باید روی یخ و به دور از نور و در تاریکی استفاده گردد. پیشنهاد نوند سلامت، یوشاندن ویال با کمک فویل آلومینیومی است.
- سایر معرف‌ها نیاز به آماده‌سازی نداشته و آماده مصرف هستند.



## ۲) آماده‌سازی نمونه‌ها:

**نمونه‌های بافتی:** در ابتدا حدود ۱۰۰ میلی‌گرم از نمونه را وزن کرده و پس از شستشوی کامل با PBS سرد، با یک میلی‌لیتر از **Sample Buffer 1X** (سرد) آماده شده، هموژن نمائید. سپس در ۸۵۰۰ دور به مدت ۱۰ دقیقه سانتریفیوژ (نوند سلامت در این مرحله استفاده از سانتریفیوژ یخچالدار را توصیه می‌کند) کرده و برای انجام آزمایش از مایع رویی به عنوان نمونه استفاده نمائید. توجه داشته باشید که مایع رویی تا زمان استفاده باید روی یخ یا در یخچال نگهداری شود.

**نمونه‌های سلولی:**  $2 \times 10^6$  سلول در یک میلی‌لیتر **Sample Buffer 1X** هموژن کرده و سپس در ۸۰۰۰ دور به مدت ۱۵ دقیقه سانتریفیوژ کنید. از محلول رویی به عنوان نمونه استفاده کنید. توجه داشته باشید که برای جداسازی سلول‌ها از کف پلیت، از مواد پروتئولیتیک (مانند تریپسین) استفاده نکنید.

**نمونه‌های ادرار، سرم و یا پلاسما:** نمونه‌های ادرار، سرم و یا پلاسما بدون رقت سازی می‌توانند استفاده شوند ولی در صورت داشتن جذب نوری بالای ۲ بهتر است نمونه‌ها را قبل از شروع آزمایش ۵ تا ۱۰ برابر با آب مقطر دیونیزه مخلوط کرده و در ۸۰۰۰ دور به مدت ۱۵ دقیقه سانتریفیوژ نمایید. از مایع رویی پس از سانتریفیوژ به عنوان نمونه استفاده نمایید.  
**توجه:** در صورت رقت سازی بایستی ضریب رقت در فرمول محاسبات اعمال گردد.

**اریتروسیت:** نمونه خون را به همراه EDTA و یا هپارین (به عنوان ماده ضد انعقاد) جمع آوری شود. پس از جدا نمودن پلاسما و باقی‌کوت از نمونه خون کامل؛ اریتروسیت‌ها را ۳ بار توسط نرمال سالین خنک شستشو دهید. جهت لیز شدن سلول‌ها، حجم نمونه را با آب مقطر دیونیزه به ۴ برابر رسانده و برای حذف استرومای اریتروسیت‌ها، نمونه را در ۸۵۰۰ دور به مدت ۱۰ دقیقه در دمای ۲-۸ درجه سانتی‌گراد، سانتریفیوژ کنید و مایع رویی را به عنوان نمونه استفاده نمایید.

## ۳) روش کار:

- در ابتدا ۱۲۵ میکرولیتر از محلول **Assay Buffer**، به همه چاهک‌های نمونه و بلانک اضافه کنید.
- ۱۲/۵ میکرولیتر از **NADPH** به تمام چاهک‌ها اضافه کرده
- مقدار ۱۲/۵ میکرولیتر از **GSSG** را به همه چاهک‌های نمونه و بلانک اضافه کنید.
- در ادامه، ۱۰ میکرولیتر از نمونه/ آب مقطر (برای چاهک بلانک) را اضافه کرده و پلیت را چند ثانیه شیک کنید تا محلول‌ها ترکیب شوند.
- مقدار ۹۰ میکرولیتر آب مقطر به همه چاهک‌ها اضافه نمایید (حجم نهایی چاهک‌ها ۲۵۰ میکرولیتر است).
- مقدار جذب نمونه را در دقیقه‌های یک تا پنج، در طول موج ۳۴۰ نانومتر خوانش کنید
- توجه داشته باشید که حتما باید دمای محلول‌ها به ۲۵ تا ۳۰ درجه سانتی‌گراد برسد.

## ۴) محاسبات:

در ابتدا میانگین خوانش‌های دقیقه‌های ۱ تا ۵ را برای نمونه‌ها محاسبه کرده و به فاصله زمانی بین ۱ تا ۵ دقیقه (۴) تقسیم کنید.

$$\Delta \text{Abs}_{340\text{nm}/\text{min}} = \left[ \frac{\text{Abs}_{340\text{nm}} \text{ Time } 5 \text{ min} - \text{Abs}_{340\text{nm}} \text{ Time } 1 \text{ min}}{4 \text{ min}} \right]$$

سپس با استفاده از فرمول زیر میزان فعالیت آنزیم گلوتاتیون ردوکتاز را محاسبه نمائید:

$$\text{GR activity} = \frac{\Delta \text{Abs}_{340\text{nm}/\text{min}}}{\epsilon} \times \frac{0.25}{0.01} \times k = \text{nmol}/\text{min}/\text{ml}$$

بطوریکه:

$\epsilon$  و یا ضریب خاموشی برای NADPH در ۳۴۰ نانومتر معادل  $0.00622 \mu\text{mol}/\text{ml} / \%$  بوده و در فرمول بالا قرار می‌گیرد.  
 $k$  ضریب رقت نمونه



## ۵) توصیه‌ها:

- محتویات کیت بر اساس دمای پیشنهادی نگهداری شود، اما معرفها قبل از شروع آزمایش باید به دمای محیط (ترجیحا دمای ۲۵ درجه سانتی‌گراد) رسیده و قبل از استفاده ورنکس نمائید به گونه‌ایی که هیچ کریستالی در معرفها دیده نشود.
- نمونه‌ها پس از آماده‌سازی باید تا زمان انجام آزمایش در یخچال و یا روی یخ نگهداری شوند.
- NADPH باید روی یخ و به دور از نور و در تاریکی استفاده گردد.
- از ایجاد کف و یا حباب در موقع مخلوط کردن مواد به‌صورت جدی پرهیز نمائید.
- از سر سمپلهای جداگانه جهت انتقال مواد در مرحله استفاده شود.
- ممکن است یک پژوهشگر نتایج متفاوت از آزمایش مشابه به دست بیاورد. توصیه می‌شود از هر نمونه ۳ بار تکرار انجام دهید و میانگین آن‌ها را به‌عنوان نتیجه نهایی در نظر بگیرید.
- رعایت زمان‌های ذکر شده در روش کار به خاطر اندازه‌گیری فعالیت آنزیم ضروری می‌باشد.
- در نمونه‌های بافتی و لیزات سلولی اندازه‌گیری پروتئین نیز توصیه می‌شود که می‌توانید بدین منظور از کیت **Nadfred™ (NS-15073 و NS-15074)** نوند سلامت استفاده نمائید.
- قبل از شروع آزمایش، از کافی بودن مقدار نمونه‌ها 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.
- در زمان کار با کیت رعایت اصول ایمنی آزمایشگاهی الزامی می‌باشد.

## ۶) عیب‌یابی:

مشکل	احتمالات موجود	راه حل‌های پیشنهادی
عدم کارکرد سنجش یا آزمایش	سرد بودن بافر آزمایش	دمای بافر باید به دمای اتاق رسیده باشد
	عدم رعایت ترتیب مراحل آزمایش	به پروتکل موجود مراجعه کرده و دقیقا پیروی نمایید
	پلیت ریدر در طول موج نادرست	تنظیمات فیلتر دستگاه را چک نمایید
نمونه‌ها با قرائت (خوانش) نامنظم یا نامعقول	آماده‌سازی نمونه‌ها با بافر نادرست	از بافر موجود در کیت استفاده نموده و یا به دستورالعمل موجود در پروتکل مراجعه نمایید
	نمونه‌های کشت بافت/سلول به صورت کامل هموژن نشده	هموژن کردن نمونه را تکرار نموده و مدت زمان مرحله‌ی همگن‌سازی را افزایش دهید
	وجود حباب در چاهک‌ها	تکان دادن پلیت جهت از بین بردن حباب‌ها
	استفاده از نمونه‌های چند بار دفریز شده	اگر نمونه‌ها چندین بار مورد استفاده قرار خواهند گرفت نمونه‌ها را در هنگام نمونه‌برداری به دو یا سه قسمت تقسیم نموده و فریز نمایید
خوانش بالا و یا پایین در نمونه‌ها و استانداردها	استفاده از نمونه‌های قدیمی یا نامناسب	ترجیحا از نمونه‌های تازه استفاده کنید
	دمای نامناسب ترکیبات	اجازه دهید تمام ترکیبات به دمای اتاق رسید، سپس به آرامی ترکیب نمایید
	استفاده از کیت منقضی شده و یا نگهداری نامناسب معرفها	تاریخ انقضای کیت را چک نموده و معرفها را در شرایط مناسب نگهداری نمایید
	قرار گرفتن طولانی مدت معرفها در معرض یخ	محلول کار را قبل از استفاده آماده کنید
	آنزیم بیش از اندازه به چاهک‌ها اضافه شده است	نمونه‌ها را با Sample Buffer رقیق نمایید
نتایج غیر منتظره	استفاده از حجم‌های نامناسب	از سمپلر کالیبره شده استفاده نمایید
	نمونه‌ها در طول موج نادرست خوانده شوند	تنظیمات فیلتر و دستگاه را بررسی نمایید
	نمونه‌ها دارای محتویات مداخله‌گر باشند	در صورت امکان نمونه را بیشتر رقیق نمایید
	خواندن نمونه در بالا و یا زیر محدوده خطی	نمونه‌های غلیظ یا رقیق کرده تا خوانایی آن‌ها در محدوده خطی قرار گیرد

- 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](mailto:hi@navandsalamat.com) یا ما در میان بگذارید.