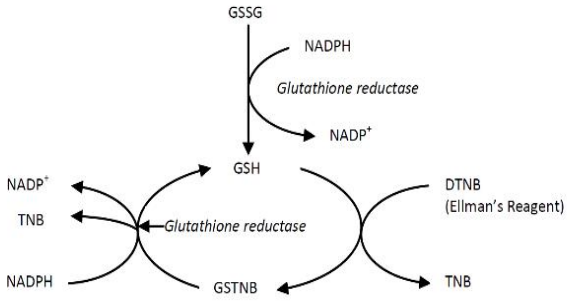
کیت سنجش گلوتاتیون (احیا)

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 دی سولفید 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	۴۸ تست	۹۶ تست
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
- PBS سرد
- میکروتیوب

Copyright © 2020 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 100 میلی‌گرم از آن را وزن کرده و ۵۰۰ تا 1000 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 9000 دور به مدت 10 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 9000 دور به مدت ۱۵ دقیقه، مایع رویی را جدا کرده و به عنوان نمونه استفاده نمائید.
- **نمونه های پلاسما، اریتروسیت:** ابتدا نمونه را در دور ۸۰۰۰ به مدت ۱۰ دقیقه و دمای ۴ درجه سانتی‌گراد سانتریفیوژ کرده و مایع روی 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:

- **Cofactor:** مقدار 2 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 سانتی گراد 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:

ابتدا رقت‌های مختلف محلول استاندارد را با روش رقیق سازی سریالی تهیه کرده و برای رسم منحنی استاندارد از آن استفاده نمائید. بدین ترتیب که ۶ عدد میکروتیوب آماده کرده و به همگی آنها مقدار ۵۰۰ میکرولیتر GSH Buffer اضافه کنید. سپس مقدار ۵۰۰ میکرولیتر از استاندارد ۴ میلی‌مولار را به میکروتیوب اول اضافه کنید. کاملا مخلوط کرده سپس ۵۰۰ میکرولیتر از محتوی میکروتیوب 1 را به میکروتیوب 2 اضافه کنید. این عمل را تا میکروتیوب آخر ادامه دهید. غلظت‌های به دست آمده به ترتیب 2 – 1 – ۰/۵ – ۰/۲۵ – ۰/۱۲۵ – ۰/۰۶۲ – میلی مولار خواهند بود.

۴) روش کار:

A. مقدار 20 میکرولیتر GSH Buffer به ۲ چاهک ردیف A به عنوان بلانک اضافه کنید.

B. مقدار 20 میکرو لیتر از هر رقت استاندارد را به چاهک‌های ردیف B تا H پلیت اضافه کنید.

C. مقدار 20 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 120 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).

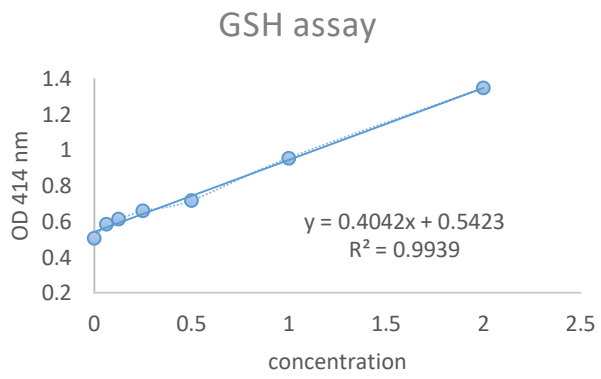
نکته: محلول حاصل از ترکیب آنزیم و DTNB را درون ورقه آلومینیومی و دور از نور نگهدارید.

E. 30 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 قرایت نمایید.

G. حداکثر زمان جهت خوانش جذب نوری ۵ دقیقه می‌باشد.

Copyright © 2020 Navand Salamat. All rights reserved



- 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 (احیا) را محاسبه نمائید.

***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)

۴) محاسبه:

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

$$\text{ضریب رقت} \times \left(\frac{\text{عرض از مبدا} - \text{جذب نوری نمونه در ۴۱۴ نانومتر}}{\text{شیب خط}}\right)$$

واحد اندازه‌گیری GSH در این کیت به میکرومولار است

۵) 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.

Copyright © 2020 Navand Salamat. All rights reserved

۶) عیب‌یابی:

مشکل	احتمالات موجود	راه حل‌های پیشنهادی
عدم کارکرد سنجش یا آزمایش	برداشتن مقدار نادرست مواد	دقت در اندازه گیری
	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
	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
	خطاهای محاسبات	بعد مراجعه به پروتکل، محاسبات را دوباره انجام دهید
عدم ایجاد رنگ در نمونه‌ها	مقدار GSH در نمونه‌ها بسیار کم است	افزایش غلظت نمونه توسط لیوفیلیز کردن
	مقدار GSH در نمونه‌ها کم است	حل کردن نمونه در مقدار کمتر GSH 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 © 2020 Navand Salamat. All rights reserved