KIAZIST Life Sciences

کیت اندازه گیری فعالیت آنزیم گلوتاتیون پراکسیداز

GPx Activity Kit

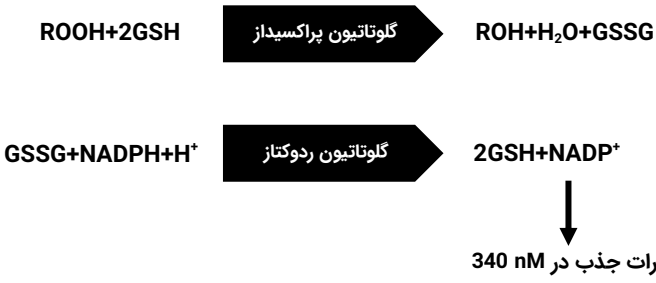
KGPX96

اصول کار

گلوتاتیون پراکسیداز (GPx) از آنزیم های آنتی اکسیدانی می باشد که با تبدیل هیدروژن پراکسید به آب و استفاده همزمان از گلوتاتیون در جلوگیری از استرس اکسیداتیو موثر است. هشت ایزوفرم از این آنزیم شناخته شده است که در پستانداران به سلنیوم وابسته می باشند. سطوح پایین آن با دیابت تیپ ۲ و نفروپاتی دیابتی، Multiple Sclerosis و سلیاک همراه بوده است.

در این کیت از واکنش جفت شونده (Coupling) در کنار آنزیم گلوتاتیون ردوکتاز و کوآنزیم آن NADPH استفاده می شود.

اصول واکنش:



اطلاعات کلی و محتویات

نگهداری و حمل:

در دمای 20°C- نگهداری شود. حمل توسط یخ مرطوب انجام می شود.

حساسیت: 0.5 mU/mL یا 0.5 nmol/min/mL

مقدار نمونه پیشنهادی

نمونه	حداکثر	مطلوب
Tissues from animal/plant	30 mg	20 mg
Cells	3×10^6	5×10^5 –1×10^6
Serum	40 µl	20 µl

محتویات کیت

شماره	ماده	مقدار/تعداد
1	GPx Buffer 10X	5 ml
2	H_2O_2 Substrate	20 µL
3	Dilution Buffer 10X	1 ml
4	Enzyme Solution	32 µl
5	Co-Substrate	Lyophilized
6	96-well Clean photometric Plate	1 PCs

موارد مورد نیاز اضافی

- ست سمپلر متغیر و چند کاناله
- سرسمپلر مناسب
- میکروتیوب ۱/۵ میلی لیتری
- سانتریفیوژ دور بالا (12000 RPM)
- دستگاه Plate Reader با طول موج 340 نانومتر
- بافر PBS یا بافر استخراج آنزیم کیازیست (KPEX50)
- مهار کننده پروتئازها (پیشنهادی کیازیست KPI100)

نکته: قبل از شروع، آزمایش با یک نمونه جهت مشخص ساختن مقدار نمونه به صورت پایلت (Pilot) به همراه یک استاندارد انجام شود.

- قبل از انجام تست کل پروتکل را بخوانید.
- انجام آزمایش به صورت پایلت (Pilot) حتما توصیه می شود.

آماده سازی نمونه

هموژن کردن بافت

نمونه بافت: ۱۰ تا ۲۰ میلی گرم از بافت را توسط سونیکاتور و یا هموژنایزر در بافر PBS (یا بافر جایگزین) که حاوی کوکتل مهارکننده پروتئاز می باشد لیز کرده و سپس در 12000 rpm به مدت ۱۵ دقیقه در ۴ درجه سانتریفیوژ کنید . سوپرناتانت را در تیوب جدید در دمای 80°C- فریز کنید.

سلول های چسبنده

محیط را خالی و سپس سلول ها را تریپسینه کرده و پس از سانتریفیوژ کردن سوپرناتانت را دور ریخته و در بافر PBS (یا بافر جایگزین) که حاوی کوکتل مهارکننده پروتئاز می باشد تا ۳ بار فریز و دفریز نمایید تا سلول ها لیز شوند. سپس در 12000 rpm به مدت ۱۵ دقیقه در ۴ درجه سانتریفیوژ کنید . سوپرناتانت را در تیوب جدید در دمای 80°C- فریز کنید.

سلول های معلق

پس از سانتریفیوژ کردن سوپرناتانت را دور ریخته و در بافر PBS (یا بافر جایگزین) که حاوی کوکتل مهارکننده پروتئاز می باشد تا ۳ بار فریز و دفریز کرده تا سلول ها لیز شوند. سپس در 12000 rpm به مدت ۱۵ دقیقه در ۴ درجه سانتریفیوژ کنید . سوپرناتانت را در تیوب جدید در دمای 80°C- فریز کنید.

نمونه پلاسما

خون را در تیوب حاوی ضد انعقاد ریخته و به مدت ۱۰ دقیقه در 1000×g سانتریفیوژ کنید . پلاسمای زرد رنگ را بدون آسپیره کردن لایه سفید بافی (لکوسیت) برداشته و تا زمان آزمایش در دمای 80°C- فریز کنید.

آماده سازی کیت

- **پس از آماده سازی نمونه موارد زیر را آماده کنید.**
- **همه محلول ها در دمای اتاق گرم شوند.**
- **Dilution Buffer 1X: یک میلی لیتر از Dilution Buffer 10X را با ۹ میلی لیتر از آب دیونیزه ترکیب کنید تا Dilution Buffer 1X آماده شود. در دمای یخچال ۲ ماه پایدار می باشد.**
- **۲ میلی لیتر از GPx Buffer 10X را با ۱۸ میلی لیتر از آب دیونیزه ترکیب کنید تا GPx Buffer 1X آماده شود. در دمای یخچال ۲ ماه پایدار می باشد.**
- **به ویال Co-Substrate 300 µL از GPx Buffer 1X اضافه کنید و به خوبی هم زده و روی یخ نگه دارید. این محلول Co-Substrate Solution نام دارد. هر نمونه ۳ میکرولیتر نیاز دارد. باقیمانده را تقسیم بندی کرده و تا یک ماه در دمای -20°C نگه دارید.**
- **به ویال Enzyme Solution یک میلی لیتر از Dilution Buffer 1X اضافه کنید تا Enzyme Working Solution آماده شود. این محلول را روی یخ نگه دارید. هر نمونه ۱۰ میکرولیتر نیاز دارد. باقیمانده را تقسیم بندی کرده و تا یک ماه در دمای -20°C نگه دارید.**
- **یک میکرولیتر از H2O2 Substrate را با ۲۰ میلی لیتر از آب دیونیزه مخلوط کنید. تا ۲ ساعت پایدار می باشد. این محلول H_2O_2 Working Solution نام دارد.**

نحوه انجام آزمایش

بر طبق جدول زیر برای هر چاهک آماده شود:

	ماده	نمونه (µL)	کنترل نمونه (µL)
	نمونه مورد آزمایش	۱-۵۰	۰
	Diluent Buffer 1X	۰	۵۰
Reaction Mix	GPx Buffer 1X	۳۷	۳۷
	Enzyme Working Solution	۱۰	۱۰
	Co-Substrate Solution	۳	۳

نکته ۱: چاهک کنترل نمونه در کل دو عدد می باشد و برای هر نمونه متغیر نمی باشد. بهتر است هر چاهک حداقل به صورت دوتایی (Duplicate) باشد.

نکته ۲: به ازای هر نمونه می توان موارد فوق را باهم مخلوط کرد تا Reaction Mix آماده شود. به هر چاهک ۵۰ میکرولیتر از Reaction Mix اضافه کرده و در انتها به مرحله بعد بروید.

مثال: برای ۱۰ نمونه، دو عدد کنترل نمونه و یک عدد به عنوان خطای سمپلر در نظر بگیرید که مجموعا ۱۳ واکنش می شود. سپس در هرچاهک 50 µL بریزید.

GPx Assay Buffer 1X = 13 × 37= 481 µL

Enzyme Working Solution = 13 × 10= 130 µL

Co-Substrate Solution = 13 × 3= 39 µL

نحوه انجام آزمایش

**مقدار نمونه از 1-50 µL می تواند باشد و در قسمت محاسبه برای هر نمونه در فرمول قرار می گیرد. در صورتیکه از حجم کمتر از ۵۰ میکرولیتر استفاده می کنید باقیمانده حجم را تا ۵۰ میکرولیتر با GPx Buffer 1X پر کنید (مثال: 27 µL نمونه را با 23 µL از GPx Buffer 1X به حجم 50 µL برسانید و در هر چاهک بریزید. در این صورت مقدار نمونه در بخش محاسبه 27 µL خواهد بود).

۱. پس از آماده سازی مواد فوق در هر چاهک پلیت را به خوبی تکان دهید تا مواد مخلوط شوند.

۲. سپس در دمای اتاق و در تاریکی به مدت ۱۵ دقیقه انکوبه کنید.

۳. نکته: فعالیت آنزیم در دمای 37°C بیشتر خواهد بود. در دمای محیط ۱۰٪ از فعالیت آنزیم کم می شود.

۴. 10 µL از H_2O_2 Working Solution را توسط سمپلر چند کاناله داخل همه چاهک ها ریخته و به خوبی هم بزنید تا واکنش بلافاصله آغاز شود.

۵. سپس جذب را بلافاصله در 340 nm به مدت کلی ۵ دقیقه و هر یک دقیقه (حالت Kinetic) بخوانید.

نکته: جذب به صورت کاهشی در هر دقیقه خواهد بود. بهترین نقاط برای محاسبه جاییست که کاهش جذب به صورت خطی باشد.

نحوه محاسبه

۱. ابتدا از چاهک های دوتایی میانگین بگیرید.

۲. برای چاهک کنترل و نمونه ها Δ340/min را محاسبه کنید.

$$\Delta 340/min = \frac{\text{جذب زمان دوم} - \text{جذب زمان اول}}{\text{زمان اول} - \text{زمان دوم}}$$

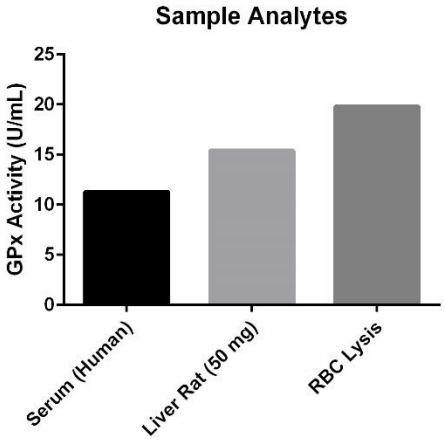
۳. سپس Δ340 چاهک کنترل را از Δ340 تک تک نمونه ها کم کنید.

نکته: سعی کنید دو نقطه از جذبی را انتخاب کنید که خطی می باشند و سپس آن دو نقطه را به همراه زمان های متناظرشان در فرمول بالا قراردهید.

۴. در آخر Δ340 هر نمونه را در فرمول زیر قرار دهید تا فعالیت آنزیم محاسبه شود:

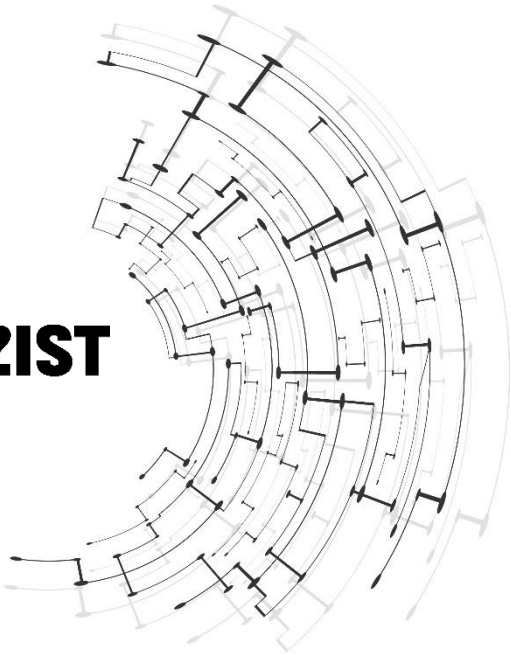
$$\text{GPx Activity} = \frac{\Delta 340/\text{min}}{0.00216\ \mu\text{M}-1} \times \frac{110}{(\text{uL})\text{مقدار نمونه}} \times \text{ضریب رقت نمونه}$$

- واحد فعالیت آنزیم nmol/min/mL یا mU/mL می باشد.
- ضریب خاموشی NADPH برابر $0.00622\ \mu M^{-1}\ cm^{-1}$ می باشد که با توجه به طول مسیر نوری در پلیت در این تست (0.47 cm) برابر $0.00216\ \mu M^{-1}$ می باشد.
- جهت نرمال سازی مقادیر بهتر است میزان پروتئین نمونه ها سنجیده شود و مقادیر برحسب میلی گرم پروتئین نرمال سازی شوند، در این صورت می توان واحد را بر حسب nmol/min/mg of protein یا mU/mg of protein گزارش کرد.


Sample Analytes
GPx Activity (U/mL)
25
20
15
10
5
0
Serum (Human)
Liver Rat (50 mg)
RBC Lysis

مشکل یابی

مشکل	علت	راه حل
عدم کارکرد تست	سرد بودن بافرها و مواد	همه مواد را به دمای اتاق برسانید
	طول موج اشتباهی	سعی کنید طول موج 340nM را انتخاب کنید
نمونه با خوانش غیر عادی	عدم هموژن شدن کامل نمونه	از هموژنازیر یا سونیکاتور استفاده کنید
	نمونه چند بار فریز-دفریز شده است	اگر نیاز به چندین بار استفاده از نمونه دارید قبل از فریز کردن آن را تقسیم بندی کنید.
	نمونه های کهنه استفاده شده است	نمونه های با ذخیره بلند مدت حتما در نیتروژن ذخیره شود
	وجود عوامل مداخله گر مانند چربی و یا بافر استخراج نامناسب	عوامل مداخله گر حذف شوند و بافر مناسب استخراج استفاده شود
جذب خیلی بالای نمونه	نمونه غلیظ وجود نمونه همولیز	نمونه را در Dilution Buffer 1X رقیق کنید
جذب خیلی پایین نمونه	نمونه رقیق	مقدار بافت اولیه را افزایش داده و از بافر استخراج مناسب استفاده کنید



KIAZIST

www.Kiazist.com

081-3450 8267
0930 402 4884

Info@Kiazist.com