KIAZIST

Life Sciences

کیت اندازه گیری فعالیت

آنزیم گلوتاتیون ردوکتاز

GSR Activity Kit

KGSR96

اصول کار

گلوتاتیون ردوکتاز (GSR) از آنزیم های آنتی اکسیدانی می باشد که گلوتاتیون اکسید شده (GSSG) را به گلوتاتیون احیا (GSH) تبدیل کرده و نقش مهمی را در مهره داران، باکتری ها و گیاهان ایفا می کند.

این آنزیم نقش بسزایی را در فاز دوم متابولیکی در پاکسازی مواد خارجی (Xenobiotic) به عهده دارد. کوآنزیم آن ریبوفلاوین می باشد که به صورت ساختار FAD در آن عملکرد دارد.

در این کیت از گلوتاتیون اکسید شده توسط آنزیم گلوتاتیون ردوکتاز احیا شده و به DTNB متصل می شود تا در طول موج ۴۰۵ نانومتر جذب داشته باشد. بر این اساس هر میکرومول از GSSG در حضور آنزیم تولید یک میکرومول از TNB می کند.

اصول واکنش:

$$GSSG + NADPH + H^+ \xrightarrow{\text{گلوتاتیون ردوکتاز}} 2GSH + NADP^+$$

+

DTNB

↓

TNB جذب در 405 nM

اطلاعات کلی و محتویات

نگهداری و حمل:
در دمای 20°C- نگهداری شود. حمل توسط یخ مرطوب انجام می شود.
محدوده اندازه گیری دینامیک: 4-32 mU/mL
حساسیت: 2 mU/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	GR Assay Buffer 10X	5 mL
2	GR Solubilizer	1.1 mL
3	GR Sample Buffer 10X	5 mL
4	GR Co-Substrate	Lyophilized
5	GR Substrate	Lyophilized
6	DTT	75 µL
7	GR DTNB	Lyophilized
8	TNB Standard	Lyophilized
9	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 ۴۰۵ نانومتر
- بافر PBS یا بافر استخراج آنزیم کیازیست (KENZ50)
- 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/سرم

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. برای سرم لوله بدون ضد انعقاد استفاده شود.

آماده سازی کیت

- پس از آماده سازی نمونه موارد زیر را آماده کنید.
- همه محلول ها در دمای اتاق گرم شوند.
- GR DTNB: در ۵۰۰ میکرولیتر GR Solubilizer حل شود. در دمای ˚C 4 تا یک هفته و در دمای ˚C 20- تا یک ماه پایدار می باشد.
- ۲ میلی لیتر از GR Assay Buffer 10X را با ۱۸ میلی لیتر از آب دیونیزه ترکیب کنید تا GR Assay Buffer 1X آماده شود. در دمای یخچال ۲ ماه پایدار می باشد.
- ۲ میلی لیتر از GR Sample Buffer 10X را با ۱۸ میلی لیتر از آب دیونیزه ترکیب کنید تا GR Sample Buffer 1X آماده شود. در دمای یخچال ۲ ماه پایدار می باشد. این محلول برای رقیق سازی نمونه های غلیظ استفاده می شود.
- به ویال GR Substrate یک میلی لیتر از GR Assay Buffer 1X اضافه کنید و به خوبی هم زده و روی یخ نگه دارید. به ویال GR Co-Substrate نیز یک میلی لیتر از GR Assay Buffer 1X اضافه کنید و به خوبی هم زده و روی یخ نگه دارید. هر نمونه 10 میکرولیتر نیاز دارد. باقیمانده را تقسیم بندی کرده و تا سه ماه در دمای °C20- نگه دارید.
- محلول استاندارد: µL 250 از GR Solubilizer به ویال TNB Standard اضافه کرده و حل کنید. سپس µL 50 از ویال DTT را به آن اضافه کنید و با µL 700 از GR Assay Buffer 1X ترکیب کرده تا TNB 5 mM حاصل شود. آن را تقسیم بندی کرده و در دمای ˚C 20- برای آزمایش های مکرر تا یک ماه نگهداری کنید.

از استاندارد TNB 5 mM آماده شده از قبل طبق جدول زیر استانداردها را بسازید:

شماره استاندارد	Assay Buffer (uL) 1X	استاندارد 5 mM (uL)	غلظت نهایی (nmol/mL)
A	۱۰۰	۰	۰
B	۹۸	۲	۱۰
C	۹۶	۴	۲۰
D	۹۴	۶	۳۰
E	۹۲	۸	۴۰
F	۹۰	۱۰	۵۰

- **سپس 100 µL از هر استاندارد به هر چاهک اضافه کنید و برای انجام نمونه بلافاصله به مرحله بعد بروید.**

نحوه انجام آزمایش

۱. بر طبق جدول زیر برای هر نمونه آماده شود:

	ماده	نمونه (µL)
	نمونه مورد آزمایش	۱-۵۰
	در صورتیکه حجم نمونه ار ۵۰ میکرولیتر کمتر می باشد، حجم نهایی را با GR Sample Buffer 1X به ۵۰ میکرولیتر برسانید	
Reaction Mix	GR Assay Buffer 1X	۲۵
	GR DTNB	۵
	GR Substrate	۱۰

نکته ۱: به ازای هر نمونه می توان موارد فوق را باهم مخلوط کرد تا Reaction Mix آماده شود. سپس به هرچاهک 40 µL از Reaction Mix اضافه نمود.

۲. در دمای اتاق به مدت ۵ دقیقه انکوبه کنید. برخی چاهک ها به دلیل وجود گلوتاتیون احیا شروع به رنگ دهی می کنند.

۳. پس از این زمان جذب نمونه ها را در 405 nM بخوانید که A1 در نظر گرفته می شود و زمان خوانش این جذب را T1 در نظر می گیریم که زمان صفر می باشد (نیاز به خوانش استانداردها در این قسمت نمی باشد) .

۴. سپس به هر چاهک به صورت همزمان (با سمپلر چند کاناله) 10 µL از GR Co-Substrate اضافه کرده و به مدت ۵ تا ۱۰ دقیقه در دمای اتاق (ترجیحا 37 °C) انکوبه کنید. (این زمان می تواند در نمونه های با فعالیت کم افزایش پیدا کند).

۵. در نهایت جذب را در 405 nm خوانش کنید که آن را A2 می نامیم و زمان خوانش آن را T2 در نظر می گیریم.

نحوه محاسبه

۱. ابتدا از چاهک های دوتایی میانگین بگیرید.

۲. سپس جذب استاندارد صفر را از همه چاهک ها کم کنید.

۳. در ادامه تفاوت جذب را برای هر نمونه محاسبه می کنیم:

ΔA= A2-A1

۴. عدد ΔA را روی منحنی استاندارد قرار دهید تا ΔD برای هر نمونه بدست آید.

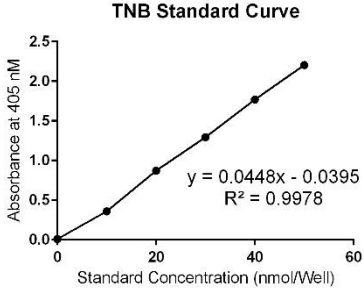
۵. سپس میانگین ΔD چاهک های کنترل را از نمونه ها کم کنید.

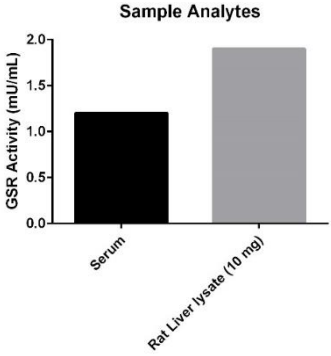
۶. در آخر ΔD هر نمونه را در فرمول زیر قرار دهید تا فعالیت آنزیم محاسبه شود:

$$\text{GR Activity} = \frac{\Delta D}{T1-T2} \times \text{ضریب رقت نمونه} \times \frac{100}{\text{مقدار نمونه در چاهک}}$$

- ΔD= تفاوت جذب نمونه از روی منحنی استاندارد
- T1=(صفر) زمان اولین جذب
- T2= زمان جذب دوم

- واحد فعالیت آنزیم nmol/min/mL یا mU/mL 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 mU/mg of protein گزارش کرد.

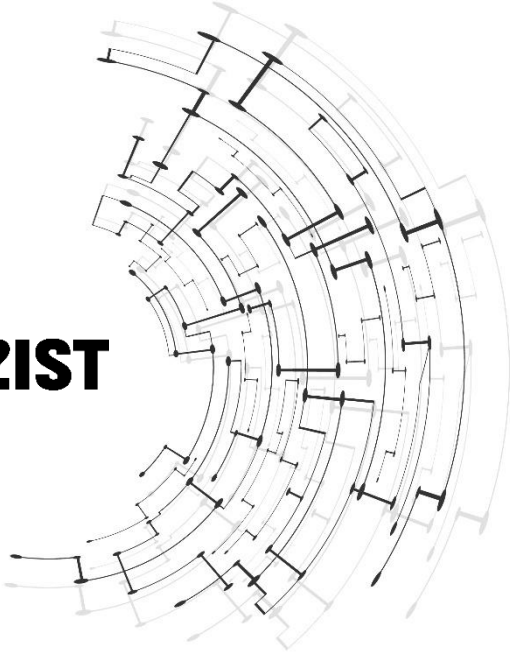

TNB Standard Curve
Absorbance at 405 nM
2.5
2.0
1.5
1.0
0.5
0.0
y = 0.0448x - 0.0395
R² = 0.9978
0
20
40
60
Standard Concentration (nmol/Well)


Sample Analytes
GSR Activity (mU/mL)
2.0
1.5
1.0
0.5
0.0
Serum
Rat Liver lysate (10 mg)

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 405 nM 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 Sample 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