KIAZIST Life Sciences

کیت اندازه گیری فعالیت آنزیم گلوتامات دهیدروژناز

GDH Assay Kit

KGDH96

اصول کار

آنزیم گلوتامات دهیدروژناز (GDH) یک آنزیم مهم در چرخه های متابولیک و کاتابولیک می باشد که به صورت برگشت پذیر گلوتامات را به آلفا-کتوگلوتارات تبدیل می کند. این آنزیم در آسیب کبدی نکروتیک و مسمومیت آن در سرم دچار افزایش می شود و به صورت افتراقی هپاتیت ویروسی را از سایر آسیب های کبدی مشخص می کند.

در این کیت به صورت همزمان از روش کالریمتریک (طول موج 570 nm) و فلورومتریک (Ex/Em=540/592 nm) فعالیت این آنزیم را به صورت دقیق پایش می نماید.

اصول واکنش:

اطلاعات کلی و محتویات

نگهداری و حمل:

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

حساسیت: **0.5 mU/mL یا** nmol/min/mL

مقدار نمونه پیشنهادی

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

محتویات کیت

شماره	ماده	مقدار/تعداد
1	**GDH Assay Buffer 10X**	**5 mL**
2	**GDH Glutamate**	**Powder**
3	**GDH Developer**	**60 µL**
4	**NAD^+ Co-substrate**	**Lyophilized**
5	**Kit Booklet**	**1 PCs**
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)
- انکوباتور با دمای 37 °C
- دستگاه Plate Reader با طول موج 570 نانومتر و یا فلوریمتریک Ex/Em=540/592 nm
- 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.

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 C˚ 80- 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 C˚ 80- 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 C˚ 80- فریز کنید.

نمونه سرم

خون را در تیوب حاوی بدون انعقاد ریخته و به مدت ۳۰ دقیقه در دمای اتاق انکوبه کرده و سپس در 1000×g سانتریفیوژ کنید . سرم زرد رنگ را بدون آسپیره کردن لایه سفید بافی (لکوسیت) برداشته و تا زمان آزمایش در دمای C˚ 80- فریز کنید.

- پس از آماده سازی نمونه موارد زیر را آماده کنید.
- همه محلول ها در دمای اتاق گرم شوند.
- ۲ میلی لیتر از GDH Assay Buffer 10X را با ۱۸ میلی لیتر از آب دیونیزه ترکیب کنید تا GDH Assay Buffer 1X آماده شود. در دمای یخچال ۲ ماه پایدار می باشد.
- GDH Solution: 50 µL از GDH Developer را با 10 mL از GDH Assay Buffer 1X ترکیب کنید (برای ۹۶ تست). این محلول تا یک ماه در دمای 4 °C پایدار است.
- به ویال GDH Glutamate 1 mL از GDH Assay Buffer 1X اضافه کنید و به خوبی هم زده و روی یخ نگه دارید یک ۳ ماه در دمای 4 °C نگه دارید.
- به ویال NAD^+ Co-substrate مقدار 200 µL از GDH Assay Buffer 1X اضافه کنید. هر نمونه به 2 µL از این محلول نیاز دارد. در صورت نیاز به نگهداری تا یک ماه در دمای 20- °C قابل نگه داری می باشد.

نحوه انجام آزمایش

بر طبق جدول زیر برای هر چاهک آماده شود:

	ماده	نمونه (µL)	چاهک کنترل (µL)
	نمونه مورد آزمایش	۵-۵۰	۰
	GDH Assay Buffer 1X	۰	۵۰
Reaction Mix	GDH solution	۸۸	۸۸
	GDH Glutamate	۱۰	۱۰
	NAD+ Co-substrate	۲	۲

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 100 µL 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 100 µL بریزید.

GDH solution = 13 × 88= 1144 µL

GDH Glutamate = 13 × 10= 130 µL

NAD+ Co-substrate = 13 × 2= 26 µL

نحوه انجام آزمایش

**مقدار نمونه از 5-50 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 GDH Assay Buffer 1X پر کنید (مثال: 27 µL نمونه را با 23 µL از GDH Assay 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 ۵ دقیقه انکوبه کنید و جذب را در 570 nm (فلورومتریک Ex/Em=540/592 nm) بخوانید و آن را A1 نامگذاری کنید. زمان آن نیز به عنوان T1 نامیده می شود.

۳. در ادامه در دمای 37 °C به مدت ۳۰ تا ۱۲۰ دقیقه (بسته به فعالیت آنزیم در نمونه) انکوبه کنید وجذب را مجددا در 570 nm (فلورومتریک Ex/Em=540/592 nm) بخوانید و آنرا A2 بنامید. زمان خوانش را نیز T2 نام گذاری کنید.

۴. توصیه می شود در صورت امکان خوانش ها به صورت کینتیک و هر ۵ دقیقه یک بار انجام شود. سپس در محدوده ای که خوانش ها خطی می شوند جذب های A1-A2 و زمان های متناظر آن ها T1-T2 انتخاب شوند.

نحوه محاسبه

۱. ابتدا از چاهک های دوتایی میانگین بگیرید.

۲. برای چاهک کنترل و نمونه ها $\Delta 570/\min$ را محاسبه کنید.

$$\Delta 570/\min = \frac{\text{جذب زمان اول}-\text{جذب زمان دوم}\ (A2)-(A1)}{\text{زمان اول}-\text{زمان دوم}\ (T2)-(T1)}$$

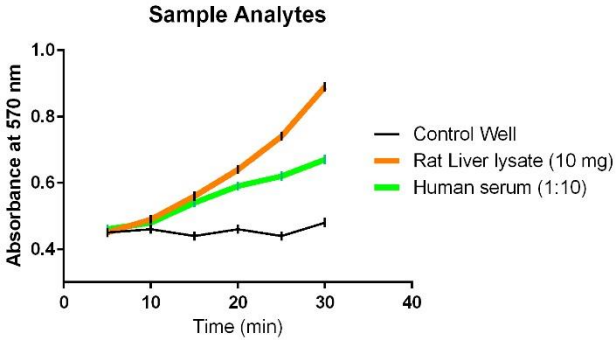
۳. سپس $\Delta 570$ چاهک کنترل را از $\Delta 570$ تک تک نمونه ها کم کنید.

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 $\Delta 570$ هر نمونه را در فرمول زیر قرار دهید تا فعالیت آنزیم محاسبه شود:

$$\text{GDH Activity} = \frac{\Delta 570/\min}{0.02538\ \mu M-1} \times \frac{150}{\text{مقدار نمونه}(uL)} \times \text{ضریب رقت نمونه}$$

- واحد فعالیت آنزیم nmol/min/mL یا mU/mL می باشد.
- ضریب خاموشی Resorufin برابر $0.054\ \mu M^{-1}\ cm^{-1}$ می باشد که با توجه به طول مسیر نوری در پلیت در این تست ($0.47\ cm$) برابر $0.002538\ \mu M^{-1}$ 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 $\text{nmol/min/mg of protein}$ یا mU/mg of protein گزارش کرد.


Sample Analytes
Absorbance at 570 nm
1.0
0.8
0.6
0.4
0
10
20
30
40
Time (min)
Control Well
Rat Liver lysate (10 mg)
Human serum (1:10)

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 570nM 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 GDH Assay 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