کیت اندازه گیری گروه های تیول آزاد (SH^-)

KTHI96

جهت سنجش ۹۶ نمونه

اصول کار

محلول Ellman که به DNTB نیز معروف است در واکنش با گروه های سولفیدریل (SH) که به حالت احیا و آزاد وجود دارند واکنش داده و رنگ زرد تولید می کند. در نتیجه گروه های تیول که اکسید شده اند و در حالت آزاد وجود ندارند در این واکنش شرکت نمی کنند.

گروه های احیا و آزاد تیول که در مولکول هایی همچون گلوتاتیون (GSH) وجود دارند خود می توانند نشان از وضعیت آنتی اکسیدانی بافت و یا نمونه بیولوژیک باشند. این مولکول به عنوان کوآنزیم آنزیم گلوتاتیون پراکسیداز نقش به سزایی درخنثی کردن رادیکال های آزاد اکسیدانی ایفا می کند.

در نهایت جذب کمپلکس DNTB و سولفیدریل احیا در طول موج ۴۰۵ نانومتر اندازه گیری می شود.

اطلاعات کلی و محتویات

نگهداری و حمل:
در دمای ٤ درجه سانتی گراد نگهداری شود. حمل توسط یخ مرطوب انجام می شود.
محدوده اندازه گیری دینامیک: 46.8-1500 µM/mL
حساسیت: 30 µM/mL

مقدار نمونه پیشنهادی

نمونه	حداکثر	مطلوب
Tissues from animal/plant	30 mg	20 mg
Cells	1.5×10^6	5×10^5 –1×10^6
Serum	30 µl	20 µl

محتویات کیت

شماره	ماده	مقدار/تعداد
1	Thiol Reagent	Powder
2	Thiol Buffer	20 mL
3	Solubilizer	300 µL
4	Thiol Standard	Powder
5	Thiol Lysis Buffer	20 mL
6	96-well Clean Photometric Plate	1 PCs

موارد مورد نیاز اضافی

- ست سمپلر متغیر
- سرسمپلر مناسب
- میکروتیوب ۱/۵ میلی لیتری
- سانتریفیوژ دور بالا (12000 RPM)
- آب دیونیزه
- دستگاه Plate Reader با قابلیت خوانش در طول موج ۴۰۵ نانومتر
- نیتروژن مایع یا هموژنایزر جهت هموژن کردن بافت

نکته: توصیه اکید می شود قبل از شروع، ابتدا جهت مشخص ساختن میزان گروه های تیول در نمونه های مورد بررسی، آزمایش توسط تعدادی از نمونه ها به صورت پایلت (Pilot) همراه با رسم استاندارد انجام شود.

****قبل از انجام تست کلیه مطالب مندرج دفترچه را تا انتها و با دقت مطالعه کنید.**

Lysis Buffer را به مدت ۱۰ دقیقه در ۴۰ درجه گرم کنید تا رسوب ها حل شوند.

هموژن کردن بافت

نمونه بافت: ۱۰ تا ۲۰ میلی گرم از بافت را توسط سونیکاتور و یا هموژنایزر در 200 uL از Lysis Buffer لیز کرده و سپس در 12000 rpm به مدت ۱۵ دقیقه در ۴ درجه سانتریفیوژ کنید . سوپرناتانت را در تیوب جدید تا زمان آزمایش در دمای -۸۰ فریز کنید.
****نکته: نمونه های دارای پروتئین بالا مانند کبد و سرم را ابتدا ۵ تا ۱۰ برابر با آب دیونیزه رقیق کنید و در آخر برای محاسبه نهایی، ضریب رقت را اعمال 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 200 uL از Lysis Buffer لیز کرده و سپس در 12000 rpm به مدت ۱۵ دقیقه در ۴ درجه سانتریفیوژ کنید . سوپرناتانت را در تیوب جدید تا زمان آزمایش در دمای -۸۰ فریز کنید.

سلول های معلق

پس از سانتریفیوژ کردن سوپرناتانت را دور ریخته و در 200 uL از Lysis Buffer لیز کرده و سپس در 12000 rpm به مدت ۱۵ دقیقه در ۴ درجه سانتریفیوژ کنید . سوپرناتانت را در تیوب جدید تا زمان آزمایش در دمای -۸۰ فریز کنید.

نمونه سرم

خون را در تیوب بدون ضد انعقاد ریخته و به مدت ۳۰ دقیقه در دمای اتاق گذاشته تا لخته شود.سپس در 2500×g به مدت ۲۰ دقیقه سانتریفیوژ کنید . سرم زرد رنگ را بدون آسپیره کردن لایه سفید بافی (لکوسیت) برداشته و تا زمان آزمایش در دمای -۸۰ فریز کنید.

- پس از آماده سازی نمونه موارد زیر را آماده کنید. محلول ها تا یک روز پس از آماده سازی پایدار هستند. همه محلولها در دمای اتاق گرم شوند.تمام مواد کیت را قبل از شروع به کار اسپین کنید تا محتویات در انتهای تیوبها جمع آوری شود.

- Thiol Reagent: مقدار 200 µL از Solubilizer را به ویال Thiol Reagent اضافه کرده و به خوبی هم بزنید. این محلول در 20- ˚C تا یک ماه قابل نگهداری می باشد.

-تعداد تست را از قبل محاسبه کنید و طبق دستور زیر عمل کنید.

* محلول کاری Thiol برای هر تست:

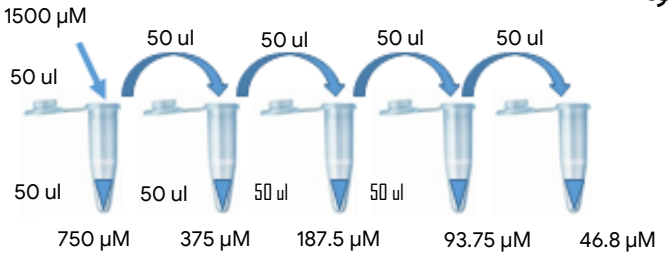
- 2 µL Thiol reagent
- 198 µL Thiol Buffer

آماده سازی استاندارد:

- به ویال استاندارد یک میلی لیتر آب دیونیزه اضافه کرده و خوب هم بزنید تا استاندارد 15 mM آماده شود. باقیمانده محلول را در 20-°C تقسیم بندی کرده تا برای آزمایشات بعدی قابل استفاده باشند.

- در یک میکروتیوب جدید، 20 uL از محلول فوق را با 180 uL آب دیونیزه مخلوط کرده تا استاندارد 1500 µM حاصل شود.

-به 5 میکروتیوب 50 uL آب دیونیزه اضافه کرده و مطابق شکل زیر Serial Dilution تهیه شود.



نحوه انجام آزمایش

۱- ابتدا به هرچاهک 10 uL از نمونه و یا استاندارد اضافه کنید. توصیه می شود هر نمونه و یا استاندارد را به صورت دوتایی (Duplicate) انجام دهید.

۲- از Lysis Buffer به عنوان بلانک استفاده کرده و 10 uL از این محلول را به چاهک بلانک اضافه نمایید.

۳- 200 uL از محلول کاری Thiol را به هرچاهک اضافه کنید و پلیت را خوب هم بزنید.

۴- درب پلیت را بر روی آن قرار داده و در دمای اتاق به مدت ۱۵ دقیقه انکوبه کنید.

۵- در نهایت جذب همه چاهک ها را در طول موج ۴۰۵ نانومتر بخوانید.

نحوه محاسبه

۱- مقدار میانگین جذب بلانک را از نمونه ها و استاندارد کم کنید.

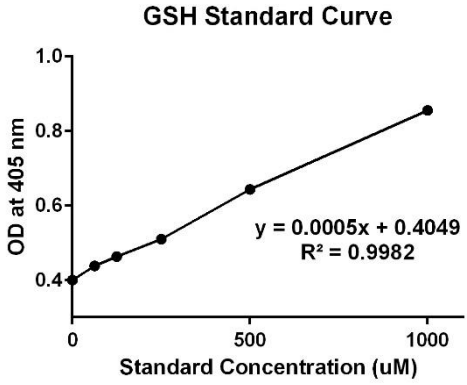
۲- با استفاده از یک نرم افزار مناسب مانند اکسل و با استفاده از جذب استانداردها منحنی استاندارد را رسم کنید و غلظت نمونه ها را حساب نمایید.

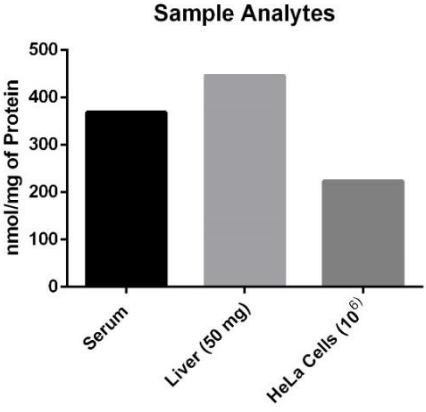
۳- در صورت رقیق نمودن نمونه در ابتدا، ضریب رقت را در عدد نهایی ضرب کنید.

۴- جهت نرمال سازی مقادیر بهتر است میزان پروتئین نمونه ها سنجیده شود و مقادیر برحسب میلی گرم پروتئین موجود در هر نمونه، نرمال سازی شوند.

برای محاسبه خودکار میتوانید با استفاده از نرم افزار Curve expert نسخه Basic محاسبات را انجام دهید.

https://www.curveexpert.net/


GSH Standard Curve
OD at 405 nm
1.0
0.8
0.6
0.4
y = 0.0005x + 0.4049
R² = 0.9982
0
500
1000
Standard Concentration (uM)


Sample Analytes
nmol/mg of Protein
500
400
300
200
100
0
Serum
Liver (50 mg)
HeLa Cells (10^6)

مشکل یابی

مشکل	علت	راه حل
جذب بالای منحنی استاندارد	مقدار نمونه اولیه بالا نمونه با پروتئین بالا	-مقدار نمونه اولیه را کم کنید -رقیق سازی نمونه در PBS Buffer
جذب پایین منحنی استاندارد	-مقدار نمونه اولیه کم -عدم وجود سولفیدریل آزاد و احیا	-مقدار نمونه را افزایش دهید -تست را در زمان سریع تری انجام دهید -از DTT 1mM استفاده کنید تا پیوند ها احیا شوند.

KIAZIST

www.Kiazist.com

081-3450 8267
0930 402 4884

Info@Kiazist.com