



کیت اندازه گیری فعالیت گلوکوتایون پراکسیداز (GPX) Glutathione peroxidase (GPX) Assay Kit CN. KPG-GPX

آنزیم گلوکوتایون پراکسیداز (GPX) آنزیمی است که در سیتوپلاسم و میتوکندری سلول‌ها یافت می‌شود. این آنزیم از گروه گلوکوتایون پراکسیدازها بوده و نقش کلیدی در پیشگیری از آسیب اکسیداتیو در سلول‌ها ایفا می‌کند. مکانیسم عملکرد این آنزیم به اینگونه است که با تبدیل گلوکوتایون احیاء شده (GSH) به گلوکوتایون اکسید شده (GSSG) عمل می‌کند. مقادیر طبیعی این آنزیم می‌تواند در پیشگیری از بیماری‌های مهمی مانند سرطان و بیماری‌های قلبی-عروقی نقش داشته باشد. در کیت کارمانیا پارس ژن میزان فعالیت آنزیم GPX در تبدیل GSH به GSSG مورد اندازه گیری قرار می‌گیرد و هر چه فعالیت آنزیم بیشتر باشد محصول نهایی با رنگ کمتری همراه خواهد بود زیرا GSH بیشتری مصرف شده و واکنش آن با ماده رنگ زا کمتر خواهد بود.

محتویات کیت:

۱. بافر رقیق کننده (Diluent Reagent) (KPG-GPXPBSS0/1)
 ۲. سوبسترا A (Substrate A) (KPG-GPXSUBSHA)
 ۳. سوبسترا B (Substrate B) (KPG-GPXSUBTBHB)
 ۴. بافر رنگ زا (Dye Buffer) (KPG-GPXDYNB)
 ۵. پلیت الایزا
- موارد مورد نیاز که در کیت موجود نیست: سمپلر و سر سمپلر، ۲. الایزا ریدر حاوی طول موج ۴۱۲ نانومتر

آماده سازی محلول ها:

- برای آماده سازی سوبسترا A، در کیت ۹۶ تستی به میزان ۲/۵ میلی لیتر (در کیت ۴۸ تستی به میزان ۱/۲۵ میلی لیتر) از بافر رقیق کننده را به ظرف سوبسترا A اضافه کرده و به خوبی مخلوط کنید.
- برای آماده سازی سوبسترا B در کیت ۹۶ تستی به میزان ۱۱/۲ میکرو لیتر از سوبسترا B را به ۲/۵ میلی لیتر از بافر رقیق کننده اضافه کرده (در ظرفی جداگانه) و به خوبی مخلوط کنید (در کیت ۴۸ تستی به میزان ۵/۶ میلی لیتر از سوبسترا B را به ۱/۲۵ میلی لیتر از بافر رقیق کننده اضافه کرده (در ظرفی جداگانه) و به خوبی مخلوط کنید).
- برای آماده سازی بافر رنگ زا به میزان در کیت ۹۶ تستی ۵ میلی لیتر (در کیت ۴۸ تستی به میزان ۲/۵ لیتر) از بافر رقیق کننده را به ظرف بافر رنگ زا اضافه کرده و به خوبی مخلوط کنید. دقت کنید که پودر کاملاً حل شده باشد. برای این منظور حداقل ۵ دقیقه روی شیکر و در دور RPM ۲۰۰ مخلوط کنید.
- تمامی محلول ها بعد از آماده سازی ۷۲ ساعت در تاریکی پایدار هستند.

آماده سازی نمونه:

در مواردی که از سرم، پلاسما یا ادرار استفاده می‌کنید نیازی به رقیق سازی نمونه نیست اما در صورتیکه در نهایت میزان فعالیت GPX در نمونه زیاد باشد رنگ نهایی کاملاً از دست رفته ($OD < 0.3$) و نمونه‌ها شبیه به هم خواهند شد. بنابراین در این موارد باید نمونه رقیق شود (معمولاً $\frac{1}{2}$). در مواردی که نمونه بافت می باشد، ابتدا ۵۰ میلی گرم از بافت را در ۵۰۰ میکرولیتر بافر رقیق کننده کاملاً هموژن کرده (این عمل در دمای سرد انجام شود، به طور مثال بافر رقیق کننده را با انکوبه یک ساعته در یخچال سرد کنید) و سپس در دور RPM ۱۰۰۰ به مدت ۱۰ دقیقه سانتریفیوژ کرده و در نهایت مایع رویی را برای انجام تست به میزان یک پنجم با بافر رقیق کننده رقیق کرده (مثلاً ۲۰ میکرولیتر نمونه با ۸۰ میکرولیتر بافر رقیق کننده) و سپس در تست استفاده کنید. دقت نمایید در صورتیکه در نهایت میزان کاهش رنگ محسوس نباشد میزان رقت را باید کم کرد (مثلاً $\frac{1}{2}$).

روش انجام تست:

۱. قبل از شروع آزمایش مطمئن شوید تمام محلول ها دارای دمای محیطی باشند.
۲. برای هر نمونه باید دو چاهک آماده کنید یکی برای تست GPX و دیگری بلانک نمونه و به هر دو چاهک ۸۷/۵ میکرولیتر از بافر رقیق کننده اضافه کنید. یک چاهک را به عنوان بلانک در نظر گرفته و به آن ۱۱۲/۵ میکرولیتر بافر رقیق کننده اضافه کنید.
۳. ۲۵ میکرولیتر نمونه به هر دو چاهک تست GPX و بلانک هر نمونه اضافه کنید و در ادامه، ۲۵ میکرولیتر سوبسترا A و ۲۵ میکرولیتر سوبسترا B را فقط به چاهک تست اصلی GPX اضافه کنید (به چاهک بلانک نمونه نباید سوبسترا a و b اضافه شود). به چاهک بلانک ۲۵ میکرولیتر سوبسترا A و ۲۵ میکرولیتر سوبسترا B اضافه کنید.
۴. پلیت را به آرامی حرکت داده تا مواد مخلوط شوند و به مدت ۲۰ دقیقه در دمای محیط و در تاریکی انکوبه کنید.
۵. به تمامی چاهک ها (به جز چاهک بلانک نمونه ها) ۵۰ میکرولیتر از بافر رنگ زا اضافه کرده و به آرامی مخلوط کنید. پلیت را به مدت ۱۰ دقیقه در دمای محیط و در تاریکی انکوبه کنید و بلافاصله در طول موج ۴۱۲ نانومتر میزان جذب نمونه ها را اندازه گیری نمایید. دقت نمایید که زمان ۱۰ دقیقه بسیار حیاتی است، بنابراین از سمپلر ۸ یا ۱۲ کاناله برای اضافه کردن بافر رنگ زا استفاده کنید.

محاسبات: برای محاسبه فعالیت GPX از فرمول زیر استفاده کنید:

$$GPX \text{ Activity (U/mL)} = \frac{\Delta A412 \times \text{Total volume} \times 1000}{13.6 \times t \times V \text{ sample}}$$

در این فرمول حجم کل (Total volume) برابر با ۰/۲۱۲۵ میلی لیتر، زمان واکنش (t) ۲۰ دقیقه و حجم نمونه ۰/۰۲۵ میلی لیتر می باشد. عدد ۱۳/۶ هم ضریب خاموشی بافر رنگزا در طول موج ۴۱۲ نانومتر است. عدد ۱۰۰۰ هم برای تبدیل واحد بوده و $\Delta A412$ هم تفاوت جذب بلانک اصلی با تفاوت جذب نمونه و بلانک نمونه میباشد:

$\Delta A412: A \text{ Blank} - (A \text{ Sample GPX} - A \text{ Sample blank})$

دقت نمایید با توجه به کاهشی بودن رنگ در نمونه های با GPX بیشتر، حتماً میزان جذب بلانک را از میزان جذب نمونه کسر کنید و بالعکس عمل نکنید. بنابراین تفاوت تفاوت جذب ها در نهایت باید در عدد ۳۱/۲۵ ضرب شده تا فعالیت آنزیم بر حسب U/mL محاسبه گردد.

$$GPX \text{ Activity (U/mL)} = \Delta A412 \times 31.25$$

دستورالعمل های ایمنی: محلول های مورد استفاده در این کیت برای بافت انسان خطرناک هستند، از این رو، در موارد تماس با پوست، چشم و غیره، با آب شسته و برای درمان اضافی به بیمارستان مراجعه کنید.

کیت های مشابه در حیطه اکسیدان ها و آنتی اکسیدان ها تولیدی کارمانیا پارس ژن:

۱. کیت بررسی فعالیت تام آنتی اکسیدانی (FRAP)
 ۲. کیت بررسی فعالیت کاتالاز
 ۳. کیت بررسی فعالیت MDA
 ۴. کیت بررسی میزان NO
 ۵. کیت بررسی فعالیت پاراکسوناز-۱
 ۶. کیت بررسی میزان استیل کولین استراز
 ۷. کیت بررسی فعالیت SOD
 ۸. کیت اندازه گیری توتال پروتئین
 ۹. کیت بررسی فعالیت میلوپراکسیداز
- کارمانیا پارس ژن تولید کننده کیت های:
۱. الایزا برای اندازه گیری سایتوکین ها
 ۲. استخراج DNA و RNA به روش های ستونی، رسوبی و نانوذرات مگنت
 ۳. اندازه گیری miRNA ها
 ۴. محصولات مرتبط با کشت سلول مانند FBS، محیط کشت و سلول های سرطانی و بنیادی مزانشیمال
 ۵. میکروتیوب ها دستگاه های Real-Time PCR
 ۶. ستون های تخلیص DNA و RNA

در صورت داشتن سول فنی با ما در تماس باشید

WWW.KARMANIAPARSGEN.IR • ۹۱۳۳۹۲۶۱۱۳