

کیت اندازه گیری فعالیت گلوکوتاتیون پراکسیداز (GPX)

Glutathione peroxidase (GPX) Assay Kit CN. KPG-GPX

آنزیم گلوکوتاتیون پراکسیداز (GPX) آنزیمی است که در سیتوپلاسم و میتوکندری سلول‌ها یافت می‌شود. این آنزیم از گروه گلوکوتاتیون پراکسیدازها بوده و نقش کلیدی در پیشگیری از آسیب اکسیداتیو در سلول‌ها ایفا می‌کند. مکانیسم عملکرد این آنزیم به اینگونه است که با تبدیل گلوکوتاتیون احیاء شده (GSH) به گلوکوتاتیون 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-GPXPBS0/1)
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 محلول‌ها:

- 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 میکرو 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 محلول‌ها 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 می‌باشد، ابتدا ۵۰ میلی گرم از بافت را در ۵۰۰ میکرو لیتر 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 ۱۰۰۰۰ 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 میکرو لیتر نمونه با ۸۰ میکرو لیتر 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 $\frac{1}{2}$). از نمونه سوپر نانت کشت سلول به دلیل داشتن معرف های رنگی حساس به Ph استفاده نکنید بلکه نمونه سلول را بایستی ابتدا از محیط جمع آوری کرد سپس با PBS شستشو داد و سپس در بافر رپا مخصوص تست های استرس اکسیداتیو (میتوانید از کارمانیا پارس ژن تهیه کنید) با دستگاه سونیکاتور کاملاً لیز کرده و لیزات سلول را سانتریفیوژ کرده و از سوپر نانت برای تست استفاده کنید. دقت نمایید، در صورتیکه دستگاه سونیکاتور ندارید، نمونه سلول غوطه ور شده در بافر رپا را به تعداد ۱۰ مرتبه فریز و ذوب کنید و در هر بار به شدت مخلوط کنید.

روش انجام تست:

۱. قبل از شروع آزمایش مطمئن شوید تمام محلول‌ها 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 میکرو لیتر از بافر رقیق کننده اضافه کنید. یک چاهک را به عنوان بلانک در نظر گرفته و به آن ۱۱۲/۵ میکرو لیتر بافر رقیق کننده اضافه کنید.
۳. ۲۵ میکرو لیتر نمونه به هر دو چاهک تست GPX و بلانک هر نمونه اضافه کنید و در ادامه، ۲۵ میکرو لیتر سوبسترا A و ۲۵ میکرو لیتر 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 میکرو لیتر سوبسترا A و ۲۵ میکرو لیتر 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 چاهک‌ها (به جز چاهک بلانک نمونه‌ها) ۵۰ میکرو لیتر 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 نمونه‌ها 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 ۲۱۲۵/۰ میلی لیتر، زمان واکنش (t) ۲۰ دقیقه و حجم نمونه ۰/۰۲۵ میلی لیتر می‌باشد. عدد ۱۲/۶ 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 نمونه‌های با GPX بیشتر، حتماً میزان جذب بلانک را از میزان جذب نمونه کسر کنید و بالعکس عمل نکنید. بنابراین تفاوت جذب‌ها در نهایت باید در عدد ۳۱/۲۵ ضرب شده تا فعالیت آنزیم بر حسب U/mL محاسبه گردد.

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

دقت داشته باشید برای نرمالایز کردن داده‌ها باید میزان توتال پروتئین را هم اندازه گیری کنید و نتایج به دست آمده از ROS را بر توتال پروتئین تقسیم کرده و داده‌ها را به صورت U/μg گزارش کنید.

برای سهولت محاسبه داده‌ها، فایل ایکسل طراحی شده توسط کمپانی KPG را از بارکد زیر دانلود کنید:



دستورالعمل‌های ایمنی: محلول‌های 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.

کیت‌های مشابه در حیطه اکسیدان‌ها و آنتی اکسیدان‌ها 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 کیت‌های:
۱. الایزا برای اندازه گیری سایتوکین‌ها
 ۲. استخراج DNA و RNA به روش‌های ستونی، رسوبی و نانوذرات مگنت
 ۳. اندازه گیری miRNAها
 ۴. محصولات مرتبط با کشت سلول مانند FBS، محیط کشت و سلول‌های سرطانی و بنیادی مزانشیمال
 ۵. میکروتیوب‌ها دستگاه‌های Real-Time PCR
 ۶. ستون‌های تخلیص DNA و RNA

در صورت داشتن سول فنی با ما در تماس باشید

WWW.KARMANIAPARSGEN.IR ۰۹۱۳۲۹۲۶۱۱۳



Glutathione peroxidase (GPX) Assay Kit CN. KPG-GPX

Glutathione peroxidase (GPX) is an enzyme found in the cytoplasm and mitochondria of cells. It is a member of the glutathione peroxidase family and plays a key role in preventing oxidative damage in cells. The mechanism of action of this enzyme is that it converts reduced glutathione (GSH) to oxidized glutathione (GSSG). Normal levels of this enzyme can play a role in preventing important diseases such as cancer and cardiovascular diseases. In the Karmania Pars Gene kit, the activity of the GPX enzyme in converting GSH to GSSG is measured, and the higher the enzyme activity, the less colored the final product will be because more GSH is consumed and its reaction with the coloring matter will be less.

Kit components:

6. Dilluent Reagent (KPG-GPXPBS0/1)
7. Substrate A (KPG-GPXSUBSHA)
8. Substrate B(KPG-GPXSUBTBHB)
9. Dye Buffer (KPG-GPXDYNB)
10. ELISA Plate

Required items that are not included in the kit:

1. Sampler and sampler head
2. Centrifuge
3. ELISA reader containing a wavelength of 412 nm

Preparation of solutions:

- To prepare Substrate A, in the 96-well kit, add 2.5 mL (in the 48-well kit, 1.25 mL) of Diluent Buffer to the Substrate A container and mix well.
- To prepare Substrate B in the 96-well kit, add 11.2 microliters of Substrate B to 2.5 mL of Dilution Buffer (in a separate container) and mix well (in the 48-well kit, add 5.6 µL of Substrate B to 1.25 mL of Dilution Buffer (in a separate container) and mix well).
- To prepare the staining buffer, add 5 ml (2.5 liters for the 48-test kit) of the dilution buffer to the staining buffer container and mix well. Make sure that the powder is completely dissolved. For this purpose, mix on a shaker at 200 RPM for at least 5 minutes.

All solutions are stable in the dark for 72 hours after preparation.

Sample preparation: In cases where you use serum, plasma or urine, there is no need to dilute the sample, but if the GPX activity in the sample is high, the final color will be completely lost ($OD < 0.3$) and the samples will be similar. Therefore, in these cases, the sample must be diluted (usually 1/2). In cases where the sample is tissue, first thoroughly homogenize 50 mg of tissue in 500 µl of dilution buffer (this should be done at cold temperature, for example, cool the dilution buffer by incubating it in the refrigerator for one hour) and then centrifuge at 10,000 RPM for 10 minutes and finally dilute the supernatant to one-fifth with dilution buffer for testing (e.g. 20 microliters of sample with 80 microliters of dilution buffer) and then use in the test. Note that if the color reduction is not noticeable in the end, the dilution should be reduced (e.g. 1/2). Do not use the cell culture supernatant for the test, as it contains pH-sensitive color indicators. Instead, first collect the cell sample from the culture medium, wash it with PBS, and then completely lyse the cells in RIPA buffer specifically intended for oxidative stress tests (you can obtain this from Karmania Pars Gene) using a sonicator. Centrifuge the cell lysate and use the resulting supernatant for the test. Note: If you do not have a sonicator, freeze and thaw the cell sample immersed in RIPA buffer 10 times, mixing vigorously each time.

Test Procedure:

1. Make sure that all solutions are at ambient temperature.
2. For each sample, prepare two wells, one for the GPX test and the other for the sample blank, and add 87.5 µL of Dilution Buffer to both wells. Consider one well as a blank and add 112.5 µL of Dilution Buffer to it.
3. Add 25 µL of sample to both the GPX test well and the blank well for each sample, then add 25 µL of Substrate A and 25 µL of Substrate B to the main GPX test well only (Substrate A and B should not be added to the sample blank well). Add 25 µL of Substrate A and 25 µL of Substrate B to the blank well.
4. Gently swirl the plate to mix the ingredients and incubate for 20 minutes at room temperature in the dark.
5. Add 50 µl of staining buffer to all wells (except the sample blank well) and mix gently. Incubate the plate for 10 minutes at room temperature in the dark and immediately measure the absorbance of the samples at 412 nm. Note that the 10-minute time is critical. Therefore, use an 8 or 12 channel sampler to add the dye buffer.

Calculations: To calculate GPX activity, use the following formula:

$$GPX \text{ Activity (U/mL)} = \frac{\Delta A_{412} \times \text{Total volume} \times 1000}{13.6 \times t \times V \text{ sample}}$$

In this formula, the total volume is 0.2125 mL, the reaction time (t) is 20 minutes, and the sample volume is 0.025 mL. The number 6.13 is the extinction coefficient of the dye buffer at 412 nm. The number 1000 is for unit conversion, and ΔA_{412} is the difference between the absorbance of the original blank and the absorbance of the sample and the sample blank:

$$\Delta A_{412}: A \text{ Blank} - (A \text{ Sample GPX} - A \text{ Sample blank})$$

Be careful, given the decrease in color in samples with higher GPX, be sure to subtract the blank absorbance from the sample absorbance and not vice versa. Therefore, the difference in absorbances should ultimately be multiplied by 25.31 to calculate enzyme activity in U/mL.

$$GPX \text{ Activity (U/mL)} = \Delta A_{412} \times 31.25$$

Please note that for data normalization, you must also measure the total protein content, divide the obtained ROS results by the total protein, and report the data as U/µg.

For easier data calculation, please download the Excel file designed by KPG Company using the barcode below:



Safety Instructions: The solutions used in this kit are hazardous to human tissue, hence, in cases of contact with skin, eyes, etc., wash with water and go to hospital for additional treatment.

Similar kits in the field of oxidants and antioxidants produced by Karmania Pars Gene:

1. Total Antioxidant Activity (FRAP) Testing Kit
2. Total Antioxidant Activity (DPPH) Testing Kit
3. Total Antioxidant Activity (ABTS) Testing Kit
4. Total Antioxidant Activity (CUPRAC) Testing Kit
5. MDA Activity Testing Kit
6. NO Level Testing Kit
7. Paraoxonase-1 Activity Testing Kit
8. Protein Carbonyl Level Testing Kit
9. SOD Activity Testing Kit
10. Acetylcholinesterase Activity
11. Total protein assay kit

Other products:

1. ELISA for measuring cytokines
2. DNA and RNA extraction by column, sedimentation and magnetic nanoparticles methods
3. Measurement of miRNAs
4. Products related to cell culture such as FBS, culture medium and cancer and mesenchymal stem cells
4. Microtubes Real-Time PCR devices
5. DNA and RNA purification columns

Contact us

+989132926113

WWW.KARMANIAPARSGEN.IR

karmaniaparsgene@gmail.com