کیت اندازه گیری گلوتاتیون اکسید شده (GSSG) ۹۶ تستی

GSSG Quantification Kit CN. KPG-GSSG96

گلوتاتیون یک تیول تریپپتید است که از اسید گلوتامیک، سیستئین و گلیسین تشکیل شده است و می تواند با محافظت از سلول‌ها در برابر آسیب رادیکال‌های آزاد به عنوان یک آنتی‌اکسیدان عمل می‌کند. گلوتاتیون در داخل سلول‌ها در هر دو فرم کاهش یافته GSH و اکسید شده GSSG وجود دارد. در سلول‌ها و بافت‌های سالم بیش از ۹۰ درصد کل گلوتاتیون در فرم GSH ست در حالی که کمتر از ۱۰ درصد در فرم GSSG است. اندازه گیری میزان GSSG می تواند یک شاخص بسیار خوب برای عملکرد این سیستم باشد. کیت کارمانیا پارس ژن برای اندازه گیری GSSG بر مبنای احیا کردن GSSG و تبدیل آن به دو GSH عمل کرده که GSH تولیدی با بافر رنگزا ایجاد رنگ زرد کرده که در طول موج ۴۱۲ نانومتر خوانش انجام می شود.

محتویات کیت:

۱. بافر رقیق کننده (Dilluent Reagent) (KPG-PBSS0.1.7)
۲. بافر احیا کننده (Regenerating buffer) (KPG-DT1M)
۳. بافر رنگ زا (Dye Buffer) (KPG-DYNB10)
۴. استاندارد (Standard 1000µM) (KPG-GSSGST)
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 **بافر رنگ زا**، در کیت ۹۶ تستی به میزان ۲۰ میلی لیتر (در کیت ۴۸ تستی به میزان ۱۰ میلی لیتر) از بافر رقیق کننده را به ظرف بافر رنگ زا اضافه کرده و به خوبی مخلوط کنید. دقت کنید که پودر کاملا حل شده باشد. برای این منظور حداقل ۵ دقیقه روی شیکر و در دور RPM ۲۰۰ مخلوط کنید.
- برای آماده سازی **بافر احیا کننده** به میزان ۲۰ میلی لیتر از بافر رقیق کننده را به ظرف بافر احیا کننده اضافه کرده و به خوبی مخلوط کنید. دقت کنید که پودر کاملا حل شده باشد. برای این منظور حداقل ۵ دقیقه روی شیکر و در دور RPM ۲۰۰ مخلوط کنید.
- برای آماده سازی **استاندارد** به میزان ۱۰ میلی لیتر از بافر رقیق کننده را به ظرف استاندارد اضافه کرده و به خوبی مخلوط کنید تا استاندارد GSH با غلظت ۱۰۰۰ میکرومول آماده شود. سپس با استفاده از بافر رقیق کننده رقت های ۵۰۰، ۲۵۰، ۱۲۵، ۶۲/۵، ۳۱/۲۵ و ۱۵/۶ میکرومول بر میلی لیتر را آماده کنید. به طور مثال برای ساخت رقت ۵۰۰ میکرومول، ۵۰۰ میکرولیتر از استاندارد ۱۰۰۰ میکرومول را با ۵۰۰ میکرولیتر بافر رقیق کننده مخلوط کنید و به همین ترتیب برای ساخت رقت ۲۵۰ میکرومول، ۵۰۰ میکرولیتر از استاندارد ۵۰۰ میکرومول را با ۵۰۰ میکرولیتر بافر رقیق کننده مخلوط کنید.

این محلول ها بعد از آماده سازی ۲۴ ساعت در دمای یخچال (۴-۸ درجه سانتیگراد) پایدار می باشند.

آماده سازی نمونه:

در مواردی که از سرم، پلاسما یا ادرار استفاده میکنید نیازی به رقیق سازی نمونه نیست اما درصورتیکه در نهایت میزان GSSG در نمونه زیاد باشد رنگ نهایی زیاد شده (OD>2) و داده ها قابل اعتماد نمی باشند. بنابراین در این موارد باید نمونه رقیق شود. در مواردی که نمونه بافت می باشد، ابتدا ۵۰ میلی گرم از بافت را در ۵۰۰ میکرولیتر بافر رقیق کننده کاملا هموژن کرده (این عمل در دمای سرد انجام شود، به طورمثال بافر رقیق کننده را با انکوبه یک ساعته در یخچال سرد کنید) و سپس در دور ۱۰۰۰۰ RPM 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 (مثلا ۲۰ میکرولیتر نمونه با ۸۰ میکرولیتر بافر رقیق کننده) و سپس در تست استفاده کنید. دقت نمایید درصورتیکه در نهایت میزان رنگ محسوس نباشد (OD<0.3) میزان رقت را باید کم کرد. از نمونه سوپرناتانت 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 ریپا مخصوص تست های استرس اکسیداتیو (میتوانید از کارمانیا پارس ژن تهیه کنید) با دستگاه سونیکاتور کاملا لیز کرده و لیزات سلول را سانتریفیوژ کرده و از سوپرناتانت برای تست استفاده کنید. دقت نمایید، درصورتیکه دستگاه سونیکاتور ندارید، نمونه سلول غوطه ور شده در بافر ریپا 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 محلول ها دارای دمای محیط باشند.
۲. برای هر نمونه دو چاهک در نظر بگیرید، یکی برای تست اصلی اندازه گیری GSSG و دیگری برای کنترل (اندازه گیری GSHهای آزاد) و در هر دو چاهک ۵۰ میکرولیتر نمونه اضافه کنید. ۵۰ میکرولیتر از هر یک از استاندارد ها به چاهک های پلیت الایزا اضافه کنید. یک چاهک را هم برای بلانک در نظر گرفته و به آن در این مرحله هیچ محلولی اضافه نکنید.
۳. ۲۰ میکرولیتر از بافر احیا کننده به یک چاهک نمونه اضافه کنید. دقت کنید فقط به چاهک نمونه تست اصلی اندازه گیری GSSG بافر احیا کننده اضافه گردد و به چاهک کنترل نمونه، استاندارد ها و بلانک نباید بافر احیاکننده اضافه گردد.
۴. پلیت را به آرامی حرکت داده تا مواد مخلوط شوند و به مدت ۴۰ دقیقه در دمای ۳۷ درجه سانتیگراد انکوبه کنید.
۵. در ادامه ۱۰۰ میکرولیتر بافر رنگ زا به تمامی چاهک ها اضافه کرده و با حرکت دادن پلیت الایزا به خوبی مخلوط کنید و بعد از گذشت ۲ دقیقه انکوباسیون در دمای محیط، در طول موج ۴۱۲ نانومتر میزان جذب نمونه ها را اندازه گیری نمایید و مقادیر را با استفاده از نمودار استاندارد و بر حسب میکرومول (µm) محاسبه کرده و مقادیر تست اصلی را از کنترل نمونه کسر کرده و سپس بر ۲ تقسیم کنید و سپس گزارش کنید (دقت نمایید با توجه به اینکه بعد از احیا شدن، از هر GSSG دو GSH به وجود می آید، بنابراین داده ها باید تقسیم بر ۲ شوند). مقادیر به دست آمده در کنترل نمونه نشان دهنده GSH های آزاد قبل از احیای GSSH در نمونه می باشند.

دقت داشته باشید برای نرمالایز کردن داده ها باید میزان توتال پروتئین (µg/mL) را هم اندازه گیری کنید و نتایج به دست آمده از GSSG را بر توتال پروتئین تقسیم کرده و داده ها را به صورت µM/µg گزارش کنید.

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 همزمان میلوپراکسیداز و میزان ROS**
۱۰. **کیت سنجش میزان فعالیت گلوتاتیون پراکسیداز (GPX)**
۱۱. **کیت بررسی میزان فعالیت آرژیناز**
۱۲. **کیت اندازه گیری گروه های تیول آزاد**

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 miRNAها**
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**
۷. **آنزیم های مولکولی از قبیل Klen-Taq DNA Polymerase، Reverse Transcriptase و پروتئیناز K**
۸. **نانوذرات آهن برای تخلیص DNA/RNA و پروتئین**

در صورت داشتن سول فنی با ما در تماس باشید

WWW.KARMANIAPARSGEN.IR۰۹۱۳۲۹۲۶۱۱۳