

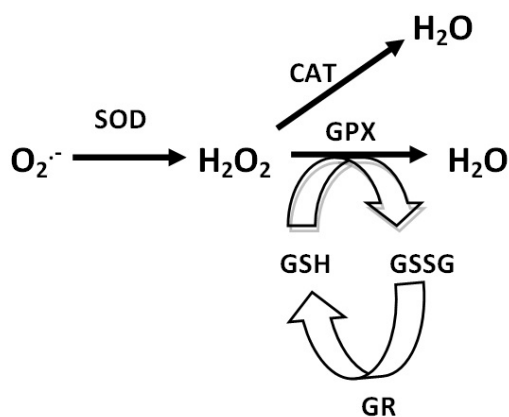
کیت سنجش گلوتاتیون احیا

Reduced Glutathione Assay Kit

(Cat-No: S1188-100 □, S1188-200 □)

الف) مقدمه

سیستم احیایی موجود در سیستم‌های زنده در پیام‌رسانی سلولی، جابجایی ماکرومولکولی و تنظیم فیزیولوژیک نقش مهمی دارد. هر گونه اختلال در این سیستم باعث بروز انواع آسیب‌های اکسیداتیو به سلول می‌شود. گلوتاتیون یک مولکول تری پپتید است که از سه اسید آمینه گلوتامات، سیستئین و گلیسین ساخته شده است. شکل احیا (GSH) آن در سیتوزول سلول‌ها به ویژه سلول‌های قرمز خون برای حفظ هموگلوبین در وضعیت احیا و جلوگیری از اکسیداسیون آن و همچنین سایر مولکول‌های سلول حیاتی می‌باشد. این مولکول در کنار مولکول‌های دیگر سیستم آنتی‌اکسیدانتی سلول‌ها یک مولکول حذف کننده پراکسید هیدروژن (توسط آنزیم گلوتاتیون پراکسیداز (GPX) و رادیکال‌های اکسیژن در نظر گرفته می‌شود. در سلول‌ها GSH توسط آنزیم گلوتاتیون ردوکتاز (GR) و به کمک $NADPH_2$ تولیدی در مسیر پنتوز فسفات از گلوتاتیون اکسید (GSSG) ساخته می‌شود (شکل زیر). از آنجایی که کاهش و یا تخلیه GSH باعث بروز انواع اثرات سمی فاکتورهای محیطی و شیمیایی و در نتیجه انواع بیماری‌ها می‌شود سنجش و برآورد سطح آن در سیستم‌های زیستی در حوزه‌های مختلف تحقیقاتی، دارویی و درمانی حائز اهمیت می‌باشد.



ب) اساس سنجش

تیول موجود در گلوتاتیون با معرف المان یعنی دی‌تیوبیس‌نیتروبنزوئیک اسید (DNTB) واکنش می‌دهد و تولید نیتروتیوبنزوات (TNB) می‌کند که رنگ آن زرد می‌باشد و در طول موج ۴۱۲nm قابل کمی‌سازی است. شدت رنگ نسبت مستقیم با تیول‌های احیایی در نمونه دارد. کیت حاضر بر اساس معرف المان (Ellman reagent) برای کمی‌سازی



گلووتاتیون احیا در نمونه‌هایی مثل پلاسما، سرم و بافت‌ها و ... طراحی شده است و حداقل تشخیص آن $0.3 \mu\text{M}$ یا 0.3 nmol/ml مولکول GSH می‌باشد.

ج) محتویات کیت

	نام ماده	۱۰۰ واکنش	۲۰۰ واکنش
۱	معرف اِلمان (DTNB)	۱۲ ml	۱۲۵ ml
۲	استاندارد GSH (۱mM)	۱ ml	۱ ml
۳	بافر لیز	۱۰۰ ml	۱۲۰۰ ml
۴	بافر رقیق کننده	۵۰ ml	۱۰۰ ml
۵	بافر واکنش	۵۰ ml	۱۰۰ ml
۶	سولفوسالسیلیک اسید ۰/۸ %	۱۲ ml	۱۲۵ ml
۷	کووت پلاستیکی	۲	۲

نگهداری کیت: تمامی اجزا سازنده کیت بجز استاندارد گلووتاتیون احیا (-20°C) را می‌توان برای ۶ ماه در یخچال نگهداری کرد.

د) روش کار

۱- آماده‌سازی استاندارد

به طور کلی می‌توان مقدار گلووتاتیون را هم توسط اسپکتروفتومتر و هم توسط میکروپلیت ریدر سنجید. بر اساس انتخاب محقق روش آماده‌سازی استاندارد و نمونه متغیر است.

الف) آماده سازی استاندارد به روش لوله آزمایش

در لوله آزمایش مطابق جدول زیر رقت‌های سریالی از محلول گلووتاتیون احیا استاندارد ۱ mM، غلظت‌های $50 \mu\text{M}$ - $0.3 \mu\text{M}$ را برای حجم نهایی $1000 \mu\text{l}$ تهیه کنید. برای تهیه محلول استاندارد گلووتاتیون از بافر رقیق کننده استفاده شود.



غلظت نهایی (μM)	۵۰	۲۵	۱۲/۵	۶/۲۵	۳/۱۲	۱/۵۶	۰/۷۸	۰
GSH (1 mM)	۵۰ μl	از ۴۰۰ μl غلظت قبلی	از ۴۰۰ μl غلظت قبلی	از ۴۰۰ μl غلظت قبلی	از ۴۰۰ μl غلظت قبلی	از ۴۰۰ μl غلظت قبلی	از ۴۰۰ μl غلظت قبلی	۰
بافر رقیق کننده (μl)	۷۵۰	۴۰۰	۴۰۰	۴۰۰	۴۰۰	۴۰۰	۴۰۰	۴۰۰
بعد از تهیه رقت‌های فوق به ۴۰۰ μl از آنها، موارد زیر را بیفزایید.								
سولفوسالیسیلیک اسید	۱۰۰	۱۰۰	۱۰۰	۱۰۰	۱۰۰	۱۰۰	۱۰۰	۱۰۰
DTNB	۱۰۰	۱۰۰	۱۰۰	۱۰۰	۱۰۰	۱۰۰	۱۰۰	۱۰۰
بافر واکنش	۴۰۰	۴۰۰	۴۰۰	۴۰۰	۴۰۰	۴۰۰	۴۰۰	۴۰۰
بعد از آماده‌سازی مخلوط فوق جذب هر یک از نمونه‌های استاندارد در طول موج ۴۱۲ nm قرائت شود.								

نکته: غلظت صفر در ستون آخر جدول فوق به عنوان بلانک در نظر گرفته شود.

ب) آماده‌سازی استاندارد به روش میکروپلیت

در این روش برای تهیه غلظت‌های استاندارد کافی است حجم‌های فوق همانند جدول زیر به یک پنجم تقلیل پیدا کند. آماده‌سازی استاندارد حداقل در تکرارهای دوتایی انجام شود.

غلظت نهایی (μM)	۵۰	۲۵	۱۲/۵	۶/۲۵	۳/۱۲	۱/۵۶	۰/۷۸	۰
GSH (1mM)	۱۰ μl	از ۸۰ μl غلظت قبلی	از ۸۰ μl قبلی	از ۸۰ μl قبلی	از ۸۰ μl قبلی	از ۸۰ μl قبلی	از ۸۰ μl قبلی	۰
بافر رقیق کننده (μl)	۱۵۰	۸۰	۸۰	۸۰	۸۰	۸۰	۸۰	۸۰
بعد از تهیه رقت‌های فوق به ۸۰ μl از آنها، موارد زیر را بیفزایید.								
سولفوسالیسیلیک اسید	۲۰	۲۰	۲۰	۲۰	۲۰	۲۰	۲۰	۲۰
DTNB	۲۰	۲۰	۲۰	۲۰	۲۰	۲۰	۲۰	۲۰
بافر واکنش	۸۰	۸۰	۸۰	۸۰	۸۰	۸۰	۸۰	۸۰
بعد از آماده‌سازی مخلوط فوق جذب هر یک از نمونه‌های استاندارد در طول موج ۴۱۲ nm قرائت شود.								



الف) آماده سازی نمونه

برای سنجش گلوکوتایون نمونه‌های سلولی و بافتی باید قبل از سنجش هموژنیزاسیون انجام شود. اما نمونه‌های سرمی، پلاسمایی و یا مایعات بدن را می‌توان بعد از تعیین غلظت پروتئین مستقیماً برای سنجش به کار برد.

۱- تهیه لیزات سلولی

تعداد 10^6 سلول را جمع آوری کرده و با PBS شسته و بعد از حذف آن، رسوب سلولی را در 80°C تا زمان استفاده نگهداری کنید. برای تهیه لیزات سلولی $100-50\ \mu\text{l}$ از بافر لیز را به رسوب سلولی اضافه نمائید و سلول‌ها را با پیپت کردن کاملاً حل کرده و به مدت ۵ دقیقه در دمای اتاق قرار دهید اگر لیزات سلول ویسکوز یا چسبنده است مقدار بیشتری بافر لیز به آن اضافه نمایید و پیپت کردن را تکرار کنید. سرانجام به مدت ۵ دقیقه با حداکثر دور rpm (۱۳۰۰۰) آن را سانتریفیوژ کرده و مایع رویی را برای سنجش گلوکوتایون جمع آوری کنید. مقداری از مایع رویی را برای تعیین غلظت پروتئینی آن توسط روش برادفورد یا لوری اختصاص دهید.

۲- تهیه هموژنات بافتی

بافت باید کاملاً با PBS شسته شود تا سلولهای خونی حذف شوند. 200 mg از بافت را در یک میلی‌لیتر بافر لیز هموژن کرده و به مدت ۵ دقیقه در میکروسانتریفیوژ یخچال دار با سرعت حداکثر سانتریفیوژ کنید و مایع رویی را برای سنجش تیول جمع آوری کنید. مقداری از مایع رویی را برای تعیین غلظت پروتئینی آن توسط روش برادفورد یا لوری اختصاص دهید.

نکته: برای بیان مقدار تیول بر حسب nmol/mg pr باید غلظت پروتئین مایع رویی با یکی از روش‌های سنجش پروتئین مثل برادفورد یا لوری سنجیده شود.

ب) سنجش نمونه

۱- مقدار ۲۰ الی $100\ \mu\text{l}$ از مایع رویی را در یک لوله آزمایش ریخته و با بافر رقیق‌کننده به حجم $400\ \mu\text{l}$ رسانده شود.

۲- سپس $100\ \mu\text{l}$ سولفوسالسیلیک اسید به آن اضافه کرده و به مدت ۱۰ دقیقه در روی یخ انکوبه کنید.

۳- پس از ۵ دقیقه سانتریفیوژ با دور 12000 g ، کل محلول رویی را به میکروتیوب جدید منتقل و مقدار $400\ \mu\text{l}$ بافر واکنش به هر یک بیفزایید.

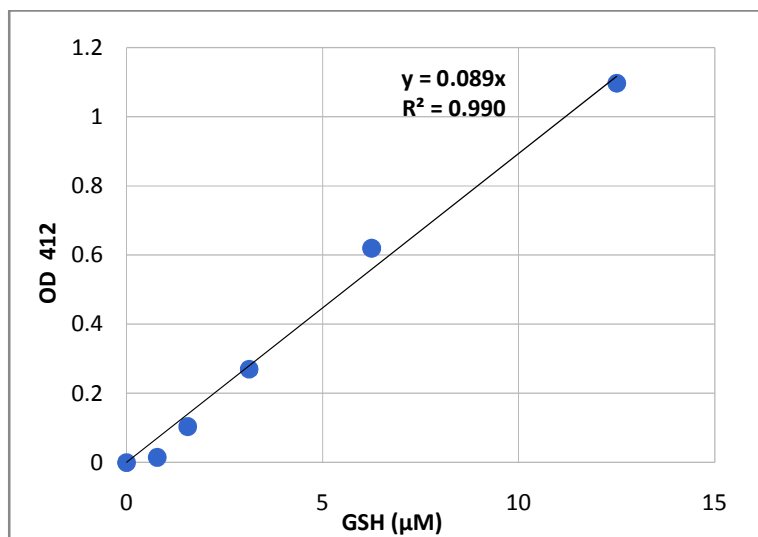
۴- مقدار $100\ \mu\text{l}$ DTNB را به آن اضافه کنید.

۵- در نهایت جذب نمونه‌ها را در طول موج 412 nm قرائت کنید.

ه) آنالیز داده‌ها



نمودار زیر مربوط به استاندارد گلوکوتاتیون می‌باشد. به کمک معادله خط برازش (Trendline)، کافی است مقدار x را پیدا کرده و آن را به غلظت پروتئینی نمونه که با برادفورد یا لوری سنجیده شده است تقسیم نمایید تا مقدار گلوکوتاتیون بر حسب μM یا nmol/mg pr به دست آید.



و) منابع

- 1) Gaucher C, Boudier A, Bonetti J, Clarot I, Leroy P, Parent M. Glutathione: Antioxidant Properties Dedicated to Nanotechnologies. *Antioxidants*. 2018;7(5):62.
- 2) Pakfetrat A, Dalirsani Z, Hashemy S, Ghazi A, Mostaan L, Anvari K, et al. Evaluation of serum levels of oxidized and reduced glutathione and total antioxidant capacity in patients with head and neck squamous cell carcinoma. *Journal of Cancer Research and Therapeutics*. [Original Article]. 2018 January 1, 2018;14(2):428-31.