

کیت دقیق سنجش تیول تام

Free Thiol Assay Kit

(Cat-No: S1180-100 □, S1180-200 □)

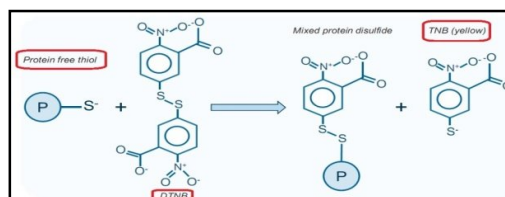
الف) مقدمه

سیستم‌های زیستی دارای اجزای احیایی هستند که در پیام‌رسانی سلولی، جابجایی ماکرومولکولی و تنظیم فیزیولوژیک نقش مهمی دارد. استرس اکسیداتیو به واسطه تغییر در فعالیت آنزیم‌ها، گیرنده‌ها، انتقال دهنده‌ها، فاکتورهای رونویسی و ماکرومولکول‌ها باعث از بین رفتن چرخه احیایی شده که پیامد آن عدم تعادل بین سیستم آنتی‌اکسیدانتی و پرواکسیدانتی می‌باشد. از آنجایی که بسیاری از پروتئین‌ها دارای تیول آزاد حساس به سیستم احیایی هستند، تعیین و کمی سازی حالت احیایی آنها سطح استرس اکسیداتیو نمونه را نشان می‌دهد.

کیت حاضر بر اساس معرف الیمان (Ellman reagent) برای کمی‌سازی تیول‌های احیا کل در نمونه‌هایی مثل پلاسما، سرم و بافت‌ها و ... طراحی شده است. تیول کل شامل تیول مولکول‌های کوچک مثل گلوکاتیون، سیستئین، هوموسیستئین و همچنین تیول موجود در سطح پروتئین‌های محلول می‌باشد.

ب) اساس سنجش

مطابق با شکل زیر تیول‌های آزاد موجود در محیط یا در سطح پروتئین با معرف الیمان یعنی دی‌تیوبیس‌نیتروبنزوتیک اسید (DTNB) واکنش می‌دهد و تولید نیترو تیوبنزوات (TNB) می‌کند که رنگ آن زرد می‌باشد و در طول موج 412nm قابل کمی‌سازی است. شدت رنگ نسبت مستقیم با تیول‌های احیایی در نمونه دارد. حداقل تشخیص کیت حاضر 2/5 μM یا 2/5 nmol/mg pr یا 2/5 تیول می‌باشد.



ج) محتویات کیت

نام ماده	۱۰۰ واکنش	۲۰۰ واکنش
۱. معرف الیمان (DTNB)	۱۲ ml	۲۵ ml
۲. استاندارد سیستئین (۱۰ mM)	۱ ml	۱ ml
۳. بافر لیز	۱۰۰ ml	۲۰۰ ml
۴. بافر رقیق کننده	۵۰ ml	۱۰۰ ml
۵. بافر واکنش	۵۰ ml	۱۰۰ ml
۶. سولفوسالیسیلیک اسید ۱٪	۱۲ ml	۲۵ ml
۷. کووت پلاستیکی	۲	۲

نگهداری کیت: تمامی اجزا سازنده کیت را بجز استاندارد تیول (۲۰ °C -) می‌توان برای ۶ ماه در یخچال نگهداری کرد.

د) روش کار

۱- آماده سازی استاندارد

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

ا. آماده سازی استاندارد به روش لوله آزمایش

در لوله آزمایش مطابق جدول زیر رقت‌های سریالی از محلول سیستئین استاندارد ۱۰ mM، غلظت‌های ۴۰۰ μM - ۲۰ برای حجم نهایی ۱۰۰۰ μl تهیه کنید. برای تهیه محلول استاندارد سیستئین از بافر رقیق کننده استفاده شود.

Thiol (μM)	۴۰۰	۲۰۰	۱۰۰	۵۰	۲۵	۱۲/۵	۰
Cysteine 10 mM	۴۰۰ μl	۴۰۰ μl از غلظت قبلی	۴۰۰ μl از غلظت قبلی	۴۰۰ μl از غلظت قبلی	۴۰۰ μl از غلظت قبلی	۴۰۰ μl از غلظت قبلی	۰
بافر رقیق کننده (μl)	۷۶۰	۴۰۰	۴۰۰	۴۰۰	۴۰۰	۴۰۰	۴۰۰
بعد از تهیه رقت‌های فوق به ۴۰۰ μl از آنها وارد زیر را بيفزایید.							
سولفوسالیسیلیک اسید	۱۰۰	۱۰۰	۱۰۰	۱۰۰	۱۰۰	۱۰۰	۱۰۰
DTNB	۱۰۰	۱۰۰	۱۰۰	۱۰۰	۱۰۰	۱۰۰	۱۰۰
بافر واکنش	۴۰۰	۴۰۰	۴۰۰	۴۰۰	۴۰۰	۴۰۰	۴۰۰
بعد از آماده‌سازی مخلوط فوق جذب هر یک از نمونه‌های استاندارد در طول موج 412 nm قرائت شود.							

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

ب. آماده سازی استاندارد به روش میکروپلیت

در این روش برای تهیه غلظت‌های استاندارد کافی است حجم‌های فوق همانند جدول زیر به یک پنجم تقلیل پیدا کند. آماده سازی استاندارد حداقل در تکرار-های دوتایی انجام شود.

Thiol (μM)	۴۰۰	۲۰۰	۱۰۰	۵۰	۲۵	۱۲/۵	۰
Cysteine 10 M	۱۶ μl	۸۰ μl از غلظت قبلی	۸۰ μl از غلظت قبلی	۸۰ μl از غلظت قبلی	۸۰ μl از غلظت قبلی	۸۰ μl از غلظت قبلی	۰
بافر رقیق کننده (μl)	۱۴۴	۸۰	۸۰	۸۰	۸۰	۸۰	۸۰
بعد از تهیه رقت‌های فوق به ۸۰ μl از آنها، موارد زیر را بيفزایید.							
سولفوسالیسیلیک اسید	۲۰	۲۰	۲۰	۲۰	۲۰	۲۰	۲۰
DTNB	۲۰	۲۰	۲۰	۲۰	۲۰	۲۰	۲۰
بافر واکنش	۸۰	۸۰	۸۰	۸۰	۸۰	۸۰	۸۰
بعد از آماده‌سازی مخلوط فوق جذب هر یک از نمونه‌های استاندارد در طول موج 412 nm قرائت شود.							



۲- آماده سازی نمونه

برای سنجش تیول تام نمونه های سلولی و بافتی باید قبل از سنجش هموئیزاسیون انجام شود. اما نمونه های سرمی، پلاسمایی و یا مایعات بدن را می توان بعد از تعیین غلظت پروتئین مستقیماً برای سنجش به کار برد.

ا. تهیه لیزات سلولی

۱۰^۶ سلول را جمع آوری کرده و با PBS شسته و بعد از حذف آن، پلت سلولی را در ۸۰ °C تا زمان استفاده نگهداری کنید. برای تهیه لیزات سلولی ۱۰۰-۵۰۰ μl از بافر لیز را به پلت سلولی اضافه نمائید و سلول ها را با پیست 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 پیست کردن را تکرار کنید. سرانجام به مدت ۵ دقیقه با حداکثر دور (۱۳۰۰۰ rpm) آن را سانتریفیوژ کرده 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.

ب. تهیه هموژنات بافتی

بافت باید کاملاً با PBS شسته شود تا سلول های خونی حذف شوند. ۲۰۰ mg از بافت را در یک میلی لیتر 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.

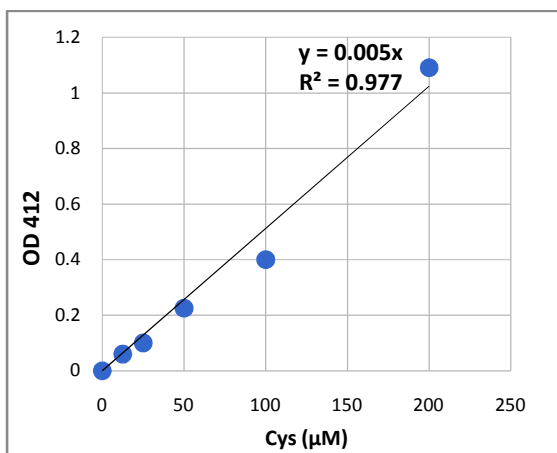
نکته: برای بیان مقدار تیول بر حسب μmol/mg باید غلظت پروتئین مایع رویی با یکی از روش های سنجش پروتئین مثل برادفورد یا لوری سنجیده شود.

۳- سنجش نمونه مجهول

- ۱- مقدار ۱۰ الی ۱۰۰ μl از مایع رویی را در یک لوله آزمایش ریخته و با بافر رقیق کننده به حجم ۴۰۰ μl رسانده شود.
- ۲- مقدار ۱۰۰ μl DTNB به آن اضافه کنید.
- ۳- پس از گذشت ۵ دقیقه، ۱۰۰ μl سولفوسالسیلیک اسید به آن افزوده و به مدت ۳۰ دقیقه روی یخ انکوبه کنید.
- ۴- پس از ۵ دقیقه سانتریفیوژ با دور ۱۲۰۰۰ g، کل محلول رویی را به میکروتیوب جدید منتقل و مقدار ۴۰۰ μl بافر واکنش به هر یک بیفزایید و دوباره با دور ۱۲۰۰۰ g سانتریفیوژ نمایید.
- ۵- در نهایت جذب نمونه ها را در طول موج ۴۱۲ nm قرائت کنید.

ه) آنالیز داده ها

نمودار زیر مربوط به استاندارد تیول می باشد. به کمک معادله خط برازش (Trendline) آن 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 تیول بر حسب μmol/mg یا μmol/mg به دست آید.



(و) منابع

- 1) Rudyk O, Eaton P. Biochemical methods for monitoring protein thiol redox states in biological systems. Redox Biol. 2014 ; 2:803-13.
- 2) Winther JR, Thorpe C. Quantification of thiols and disulfides. BiochimBiophysActa. 2014; 1840(2):838-46.
- 3) Shetab-Boushehri SV. Ellman's method is still an appropriate method for measurement of cholinesterases activities. EXCLI J. 2018; 17:798-9.