

ARBEIDSBESKRIVELSE

Institutt for husdyr – og akvakulturvitenskap, UMB

Metodenavn: **Glutathionperoxidase (G-px)**

IHA-nr.: ARB1160G-px

1. Innledning

Glutathion (GSH) spiller en viktig rolle for å beskytte cellene mot oksydering, hvor GSH virker som en direkte hemmer av frie radikaler Eller gjennom GSH-avhengige enzymer slik som GSH-peroxidase, GSH-reductase og GSH-transferase

.

.

2. Utstyr

TT-rør m/kork

Finnpipette m/spisser

Carlsbergpipetter

Kolber (25-50ml)

Iskar

Wortexmixer

Prøvekopper, engangskvetter og reagenskopper til analysatoren som er et automatisert Spektrofotometer av typen Cobas Mira S.

3. Reagenser

KH_2PO_4

EDTA

Reduced glutatione

NaDPH

Glutation Reductase

Na-azide

Drabkins reagens

Cumene hydroperoxide

Etanol

4. Arbeidsbeskrivelse

A. Prøvemateriale

Blodprøver tas på vacutainere tilsatt heparin. Analysen kan tas i helblod og plasma. Begge deler kan fryses inntil analysering. Man bør helst ha 0,5-1,0ml plasma eller helblod til analysen.

B. Fortynning

Helblod fortynnes slik: Blod fra sau og geit---0,05ml+1,5ml destillert vann. Fort.1:30

Blod fra ku, hest og andre-----0,05ml+1ml destillert vann. Fort. 1:20

Plasma fortynnes vanligvis ikke. Prøver og reagenser MÅ stå på is under hele analysen.

C. Tillaging av reagenser

Det brukes to reagenser **R₁** og **R₂(start)** som pipetteres og tilsettes prøven hver for seg.

R₁: består av 6 elementer som blandes like før start.

1. Fosfatbuffer, 0,5M, pH= 7,4 (justeres med NaOH) 6,8g KH₂PO₄ (kjemikalierom 2etg.) 1,86g EDTA (ethylenediaminetetra-acetic acid) (Titriplex) (kjemikalierom 2etg.) til 1 l destille
2. Reduced Glutathion (kjøleskap(samleglass)lab 1 etg)
Vei inn 20mg og løs i 1 ml destillert vann.
3. NADPH (fryser på fryserlab 1etg.)
Vei inn 7mg og løs i 1 ml destillert vann.
4. Glutathion Reductase (kjøleskap 8 på lab 1etg) Ferdig til bruk.
5. Na-azid (giftskap på foraskningsrommet 2etg.)
Vei inn 0,366g og løs i 5ml destillert vann.
6. Drabkins reagens (giftskap på foraskningsrommet 2etg.)
En flaske Drabkins løses i 500ml destillert vann. Holdbar i 6 mnd. ved romtemperatur.

Like før analysering blandes alle ingrediensene til R₁ slik:

1.26ml+ 2. 1ml+ 3. 1ml+ 4. 0,1ml 5. 0,1ml 6. 0,5ml

Blandingen fylles i reagenskopp 1 og settes på instrumentet.

R₂(start)

50µl Cumene hydroperoxide løses i 25ml etanol og fylles i en reagenskopp som settes i posisjon 2 på instrumentet.

5. Utførelse

Pipeter de fortynnede prøvene eller plasma i prøvekoppene. Ta med en kontroll(merket kontroll G-px) som ligger i -80°C fryser på fryser-rom 1 etg. Programmer instrumentet i henhold til manualen(benk ved siden av instrumentet lab 1etg). Koden til G-px ligger på level 2H.

Sett en prøvekopp med dest. vann i 8 pos.på kontroll/calibrator-rekken for at reag.blanken skal trekkes fra.

6. Kontakt

Det er etablert kontakt mellom IHF v/Inger Joh. Jørgensen og Ulla Jensen v/Labovet Diagnostics i Danmark. Sammenlikning av resultater viser at en normal ku har et Gp-X-nivå som ligger på ca.18000U/l.Det finnes også en standard/kontroll Gluthationperoxidase SIGMA G 6137. Den kan kjøpes hos Heidenrich tlf.22 22 04 11.

Adr. Til Ulla Jensen er:

Labovet Diagnostics

Naverland 11

Post box 1317

2600 Glostrup

Tlf. 43428543

e-mail: labovetlabovet@yahoo.dk