

Opinnäytetyö (AMK)

Bio-ja elintarviketekniikka

Biotekniikka

2014

Johanna Tammi

HAPPIRADIKAALI- JA ANTIOKSIDANTTIPUOLUSTUS- MITTAUSTEN OPTIMOINTI LOHIKALOJEN VERELLE JA SILMÄLOISILLE.



TURUN AMMATTIKORKEAKOULU
TURKU UNIVERSITY OF APPLIED SCIENCES

OPINNÄYTETYÖ (AMK) | TIIVISTELMÄ

TURUN AMMATTIKORKEAKOULU

Bio- ja elintarviketekniikan koulutusohjelma | Biotekniikka

Syyskuu 2014 | 51

Ohjaajat: Mirella Kanerva (FM) ja Ilari Suominen (FT)

Johanna Tammi

HAPPIRADIKAALI- JA ANTIOKSIDANTTIPUOLUSTUSMITTAUSTEN OPTIMOINTI LOHIKALOJEN VERELLE JA SILMÄLOISILLE.

Opinnäytetyön ensimmäisenä tavoitteena oli validoida mittausmenetelmä reaktiivisten happiradikaalien mittaamiseksi lohikalojen verestä. Validoinnin kohteina olivat: veren ja DCFH-DA:n konsentraatiot, standardi, standardin konsentraatio, standardipisteet, sisäinen standardi, inkubaatiolämpötila ja mittauksen toistettavuus. Näistä validoinnin kohteista tehtiin useita erilaisia kuvaajia, joiden tulkinnan perusteella valittiin parhaimmat vaihtoehdot varsinaiseen ROS-mittaukseen.

Toisessa vaiheessa käytettiin jo aikaisemmin validoituja antioksidanttipuolustuksen mittausmenetelmiä joihin oli tarkoituksena soveltaa uutta näytematriisia eli silmäloisia. Näytematriisin pieni koko aiheutti haasteita, koska sitä ei ollut mahdollista homogenisoida suurempaan näytemäärään, sillä muuten näyteen proteiinipitoisuudet olisivat laskeneet liikaa.

ASIASANAT:

Reaktiiviset happiradikaalit, antioksidanttipuolustusmittaus, 2',7'-diklooridivetyfluoreseiini diasetaatti

BACHELOR'S THESIS | ABSTRACT

TURKU UNIVERSITY OF APPLIED SCIENCES

Biotechnology and Food Technology | Biotechnology

September 2014 | 53

Mirella Kanerva (MSc) and Ilari Suominen (PhD)

Johanna Tammi

OPTIMIZATION OF REACTIVE OXYGEN AND ANTIOXIDANT DEFENCE MEASUREMENTS FOR SALMON BLOOD SAMPLES AND EYE PARASITES

The purpose of this thesis was to validate a measurement for reactive oxygen species from salmon fish blood. The validation covered: concentrations of blood and DCFH-DA, the standard, concentration of standard, standard points, internal standard, incubation temperature and repeatability of measurement. Several different graphs were drawn for each validation target, to select the best options for the actual measurement of ROS.

The aim of the second part of this thesis was to use measurements of antioxidant defense previously validated for other kinds of tissue samples, but this time with a new sample matrix, eye parasites. The small size of the sample matrix was challenging because it was not possible to homogenize it into a larger volume, since otherwise the amount of protein would have been diluted excessively.

KEYWORDS:

Reactive oxygen species, Antioxidant defense measurements, 2',7'-dichlorodihydrofluorescein diacetate

SISÄLTÖ

KÄYTETYT LYHENTEET (TAI SANASTO)	7
1. JOHDANTO	8
2. REAKTIIVISET HAPPIRADIKAALIT	10
3. 2',7'-DIKLOORIFLUORESEIINI DIASETAATTI	13
4. FLUORESENSSI JA ABSORBAATIOMITTAUS	15
4.1 PerkinElmerin Envisionin kuoppalevyn lukija	15
4.2 Annostelija	15
5. NÄYTTEET	17
5.1 Verinäytteet	18
5.2 Silmä joka on terve tai infektoitunut silmäloisilla	18
5.3 Koejärjestelyt	20
6. REAKTIIVISTEN HAPPIRADIKAALIEN MITTAUKSEN OPTIMOINTI	22
6.1 Verikonsentraatio	22
6.2 DCFH-DA:n konsentraatio	22
6.3 Standardin valitseminen	23
6.4 Standardipisteet	23
6.5 Standardin konsentraatio	23
6.6 Sisäinen standardi	24
6.7 Inkubaatiolämpötila	24
6.8 Mittauksen toistettavuus	24
7. SILMÄLOISTEN NÄYTEMATRIISIN OPTIMOIMINEN	25
7.1 Näytteen käsittely	25
8. TULOKSET / ROS-MITTAUS	27
8.1 ROS-mittaus	27
8.1.1 Verinäytteen konsentraatio	27
8.1.2 DCFH-DA:n konsentraatio	28
8.1.3 Standardin valinta	29
8.1.4 Standardin pitoisuus	38

8.1.5 Standardipisteet	38
8.1.6 Sisäinen standardi	39
8.1.7 Inkubaatiolämpötila	39
8.1.8 Lämpötila ja aktiivisuus	40
8.1.9 Mittauksen toistettavuus	41
8.1.10 Optimoitu ROS-mittaus	42
9. TULOKSET/SILMÄLOISET	44
9.1 Silmäloisten näytteenkäsittely	44
9.1.1 Silmäloisten proteiininmääritys	44
9.1.2 GP	46
9.1.3 GR	48
9.1.4 GSH-GSSG	49
9.1.5 SOD	50
9.1.6 CAT	50
9.1.7 GST	50
9.1.8 G6PDH	50
LÄHTEET	51

LIITTEET

Liite 1. Tissue Preparation for and measurement of ROS parameters

KUVAT

Kuva 1. Reaktiivisten happiradikaalien muodostuminen (Bayir, 2005, muokattu kuva)	12
Kuva 2. Reaktiivisten happilajien aineenvaihduntareitit (Mirella Kanerva, muokattu kuva)	12
Kuva 3. DCFH-DA:n rakenteen muuttuminen fluoresenssimittauksissa. (Afri ym. 2004, muokattu kuva)	13
Kuva 4. PerkinElmerin envision-kuoppalevynlukija.	15
Kuva 5. PerkinElmerin envision-kuoppalevynlukijan automatisoitu annostelija.	16
Kuva 6. Kuvassa on yksi tutkimuskaloista, järvilohi, jolta otettiin näytteitä mittauksia varten. (© Mirella Kanerva)	17
Kuva 7. Kuvassa on yksi tutkimuskaloista, nieriä, jolta otettiin näytteitä mittauksia varten. (© Mirella Kanerva)	18
Kuva 8. Terve silmä. (© Mirella Kanerva)	19

Kuva 9. Infektoitunut silmä. (© Mirella Kanerva)	19
Kuva 10. Preparoidut kalan silmät. (© Mirella Kanerva)	20
Kuva 11. Homogenisointilaitteisto.	26

KUVIOT

Kuvio 1. (a-f) Verinäytteiden tulokset eri pitoisuuksilla. Näytteiden lyhenteitä ovat ST1 & ST2 (lohesta peräisin olevat näytteet), CT1 & CT2 (nierästä peräisin olevat näytteet) ja A1 & B2 (joko lohesta tai nierästä peräisin olevat näytteet).	28
Kuvio 2. a-d. DCFH-DA:n vaikutus eri näytepitoisuuksiin.	29
Kuvio 3. Standardien positiiviset ja negatiiviset tulokset.	30
Kuvio 4. Parhaimmat standardit ja standardin laimennokset.	31
Kuvio 5. Huonoimmat standardit ja standardin laimennokset.	31
Kuvio 6. Kumenen eri konsentraatioiden tulokset.	33
Kuvio 7. Vetyperoksidin eri konsentraatioiden tulokset.	33
Kuvio 8. Tert-butyylhydroperoksidin konsentraatioiden eri tulokset.	35
Kuvio 9. 1 ja 5 mM Tert-butyylhydroperoksidin aktiivisuuden tulokset 25°C:ssa.	36
Kuvio 10. 50 ja 100 mM vetyperoksidien aktiivisuuden tulokset 32 °C:ssa.	36
Kuvio 11. Tert-butyylhydroperoksidin ja DCFH-DA:n tulokset.	37
Kuvio 12. Vetyperoksidin ja DCFH-DA:n tulokset.	37
Kuvio 13. Jokaisen standardivaihtoehdon standardisuora.	39
Kuvio 14. Aktiivisuuden tulokset eri lämpötiloilla.	40
Kuvio 15. Näytteiden aktiivisuus ja toistettavuus.	41
Kuvio 16. Nieriänäytteiden kaikki proteiinitulokset.	45
Kuvio 17. Lohinäytteiden kaikki proteiinitulokset.	46
Kuvio 18. Lohen testinäytteiden suorat 2 ja 4 µl pitoisuuksilla.	48
Kuvio 19. Nieriän testinäytteiden suorat 2 ja 4 µl pitoisuuksilla.	48

TAULUKOT

Taulukko 1. Lohikalojen koejärjestelyt.	20
Taulukko 2. Kumenen eri pitoisuuksien positiiviset ja negatiiviset lukumäärät.	32
Taulukko 3. Vetyperoksidin pitoisuuksien vertailu hajonnan perusteella.	34
Taulukko 4. Eri vahvuisten vetyperoksidikonsentraatioiden hajonnat.	38
Taulukko 5. 50 mM vetyperoksidin negatiiviset ja positiiviset tulokset joista on vähennetty fluoresenssin tulos ennen sisäisen standardin lisäystä.	41
Taulukko 6. Näytteiden proteiinitulosten minimi, maksimi ja keskiarvo.	45
Taulukko 7. GP-mittausten positiivisten ja negatiivisten lukumäärät.	47
Taulukko 8. GP-mittausten kaikki tulokset.	47
Taulukko 9. Levyjen väliset erot.	49
Taulukko 10. Lohikontrollien tulokset.	49

KÄYTETYT LYHENTEET (TAI SANASTO)

Lyhenne	Lyhenteen selitys
CAT	Katalaasi
DCF	2',7'-dikloorifluoreseiini
DCFH	2',7'-diklooridivetyfluoreseiini, 2',7'-dikloorifluoreseiini
DCFH-DA, DCFDA	2',7'-diklooridivetyfluoreseiini diasetaatti, 2',7'-dikloorifluoreseiini diasetaatti
G6PDH	Glukoosi-6-fosfaattidehydrogenaasi
GPx	Glutacioni peroksidaasi
GR	Glutacionireduktaasi
GSH	Glutacioni
GSSG	Hapettunut glutacioni
GST	Glutacioni-S-transferaasi
ROS	Reaktiiviset happiradikaalit
RS	Happiradikaali
SOD	Superoksididismutaasi

1. JOHDANTO

Tämä opinnäytetyö on tehty Turun Yliopiston biologian laitoksen eläinfysiologian osastolla. Opinnäytetyö liittyy Mirella Kanervan tutkimusprojektiin joka on osa Mikko Nikinmaan johtamaa tutkimusryhmää.

Tutkimuksella pyritään selvittämään happipitoisuuden muutoksien, lämpötilan nousun, ympäristön rehevöitymisen ja ympäristömyrkköjen vaikutuksia erityisesti kaloihin, mutta myös muihin selkärangkaisiin. Tärkeä näkökulma on selvittää miten eläimet reagoivat, kun useita ympäristöstressejä esiintyy samanaikaisesti. Tehtävä työ selvittää Itämeren pilaantumisen ja ilmastomuutoksen aiheuttamien elintoimintojen häiriöiden mekanismeja ja eläinten mahdollisuuksia sopeutua muuttuvaan ympäristöön.

Tutkimusta tehdään molekyylitasolta, jossa selvitetään ympäristösopeutumien molekyylitasolla mekanismeja ekosysteemitasolle asti, jossa tutkitaan miten molekyylitasolla mekanismeja käytetään hyväksi luonnonpopulaatioiden sopeutuksessa muuttuvaan ympäristöön. Tämän osatutkimuksen on tarkoitus selvittää kaloilla yleisen diplostomum-loisinfektion molekyylitasolla vaikutuksia sekä kalan että loisen hapetus-pelkistystasapainossa. Tarkoituksena on tutkia vaikuttaako loisten määrä kalan reaktiivisten happiradikaalien tuotantoon, joka on myös osa immuunijärjestelmää ja onko loisten antioksidanttipuolustuksessa eroa riippuen loismäärästä ja kalan reaktiivisten happiradikaalien tuotannosta.

Opinnäytetyö jakaantui kahteen osioon, jossa ensimmäisessä oli tarkoitus optimoida parhaimmat olosuhteet reaktiivisten happiradikaalien mittausten suorittamiseen kun näytteinä oli lohen ja nieriän verta. Toisessa osiossa oli tarkoitus käyttää jo valdoiduja menetelmiä, mutta uudenlaisen näytematriisin kanssa. Tämä uusi näytematriisi oli lohen ja nieriän silmäloisnäytteet, joiden pienen fyysisen koon takia ne olivat laimennettava pienempään tilavuuteen homogenisointivaiheessa.

Tutkituista kaloista puolet oli infektoituneita silmäloisilla ja puolet oli terveitä, jotta tuloksista olisi mahdollista selvittää sisältävätkö kalat joilla on silmäloisia enemmän reaktiivisia happiradikaaleja kuin kalat jotka ovat täysin terveitä. Tutkimusvaiheessa kalojen elinolot olivat erilaiset kuukauden ajan ja kaloja pidettiin neljässä eri tankissa kesän ajan. Yhdessä tankissa oli n. 60 kalaa, joista puolet oli infektoituneita ja puolet terveitä.

Reaktiivisten happiradikaalien mittauksen optimointi vei suurimman osan opin-
näytetyön ajasta koska se oli niin monivaiheinen ja tulkinnan osaltaan laaja.
Tuloksia tulkittiin erilaisten kuvaajien avulla ja etsittiin mahdollisesti muodostu-
via trendejä. Validointi onnistui kuitenkin hyvin ja mittauksen tulokset testinäyt-
teiden kanssa olivat toistettavasti hyvät.

Silmäloisnäytteet saatiin toimimaan osalla antioksidanttipuolustusmittausten
menetelmistä, mutta ei kaikilla. Myös rajallisen näytemäärän takia ei kaikkia
antioksidanttipuolustusmittauksen menetelmiä voitu edes kokeilla.

Tutkimuksia jatketaan tämän opinnäytetyön jälkeen vielä mittaamalla ROS-
mittausten näytteitä, joista saadaan selville sisältävätkö infektoituneet kalat
enemmän reaktiivisia happiradikaaleja kuin terveet kalat, joilla ei ole silmäloisia.

2. REAKTIIVISET HAPPIRADIKAALIT

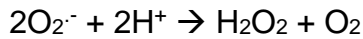
Reaktiiviset happiradikaalit eli ROS on termi joka sisältää sekä happiradikaalit että radikaalittomat hapettimet. Vapaa happiradikaali sisältää yhden tai useamman parittoman elektronin. Happiradikaaleja ovat superoksidin ($O_2^{\cdot-}$), hydroksyylin (OH^{\cdot}), peroksyilin (RO_2^{\cdot}) ja hydroksyyliperoksyilin (HO_2^{\cdot}) radikaalit. Radikaalittomia hapettimia ovat vetyperoksidi (H_2O_2), alikloorihapoke ($HOCl$) ja otsoni (O_3) jotka voidaan muuntaa helposti radikaaleiksi. (Halliwell & Gutteridge 1989)

Reaktiivisia happiradikaaleja muodostuu myös aivan normaalissa metaboliassa ja ne ovat mukana entsyymaattisissa reaktioissa, mitokondrion elektronien kuljetuksissa, signaalintransduktiossa, aktivoimassa tuman transkription tekijöitä, geeni-ekspressiossa ja niillä on neutrofiilien ja makrofiilien mikrobeja tuhoava vaikutus. (Zhang ym. 1990)

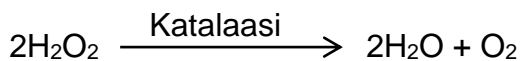
Yleisesti solujen sisällä oleva pelkistävä ympäristö auttaa ehkäisemään vapaiden radikaalien välittämää vahinkoa (kuva 2). Tätä pelkistävää ympäristöä ylläpidetään antioksidanttien entsyymeillä ja aineiden toiminnalla. Näitä antioksidantteja ovat superoksidaasidismutaasi (SOD), katalaasi (CAT), glutationeperoksidaasi (GPx), glutationi askorbaatti, α -tokoferoli ja tioredoksiini. Antioksidanttien altistuminen oksidanteiksi johtaa oksidatiiviseen stressiin ja tuloksena on oksidatiivinen vahingoittuminen. (Zhang ym. 1990)

Happimolekyyli (O_2) luokitellaan radikaaliksi koska sillä on kaksi paritonta elektronia ja sitä pidetään hyvin vahvana hapettimena. Happi ottaa vastaan yhden elektronin kerrallaan ja elektronien peräkkäiset lisäykset johtavat reaktiivisten happiradikaalien muodostumiseen. (Zhang ym. 1990)

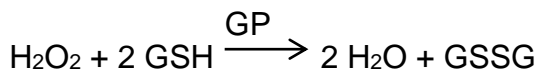
Ylimääräisen $O_2^{\cdot-}$ poistaminen SOD-entsyymien avulla on tärkeä puolustusmekanismi aerobisille organismeille (Fridovich 1989). SOD siis muuttaa superoksidin vetyperoksidiksi. SOD-entsyymien erilaiset muodot muuttavat $O_2^{\cdot-}$:n H_2O_2 :ksi seuraavan reaktion mukaisesti: (Halliwell & Gutteridge 1989)



Vetyperoksidi H_2O_2 on heikosti reagoiva hapetin, mutta läpäisee solukalvon helposti. Vetyperoksidi ei sisällä paritonta määrää elektroneja ja ei ole siksi radikaali, mutta saattaa hapettaa tiettyjä proteiinin tioliryhmiä (Halliwell & Gutteridge 1989). H_2O_2 voidaan poistaa katalaasireaktiolla, jossa muodostuu happi ja kaksi vesimolekyyliä seuraavan reaktioyhtälön mukaisesti: (Salvemini & Cuzzocrea 2002)

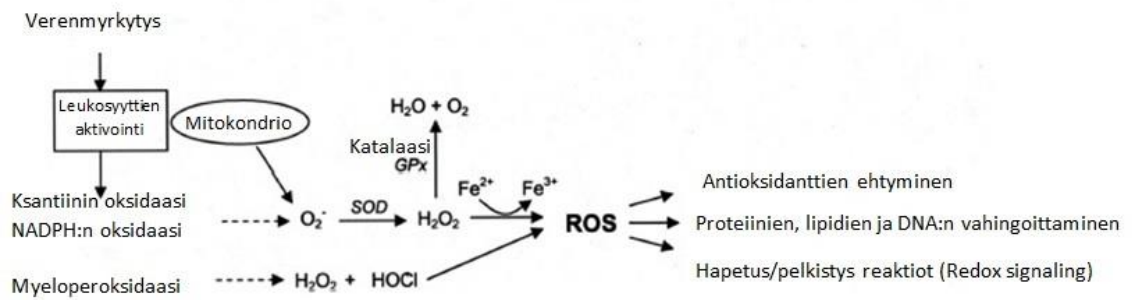


H_2O_2 :n peroksidaatioissa pelkistiminä käytetään glutationia, askorbaattia, tioredoksiinia, redusoitua eli pelkistynyttä nikotinamidin adeniinin dinukleotidejä tai fenolisia yhdisteitä. H_2O_2 :n peroksidaatioissa muodostuu kaksi molekyyliä vettä seuraavan reaktioyhtälön mukaisesti: (Salvemini & Cuzzocrea 2002)



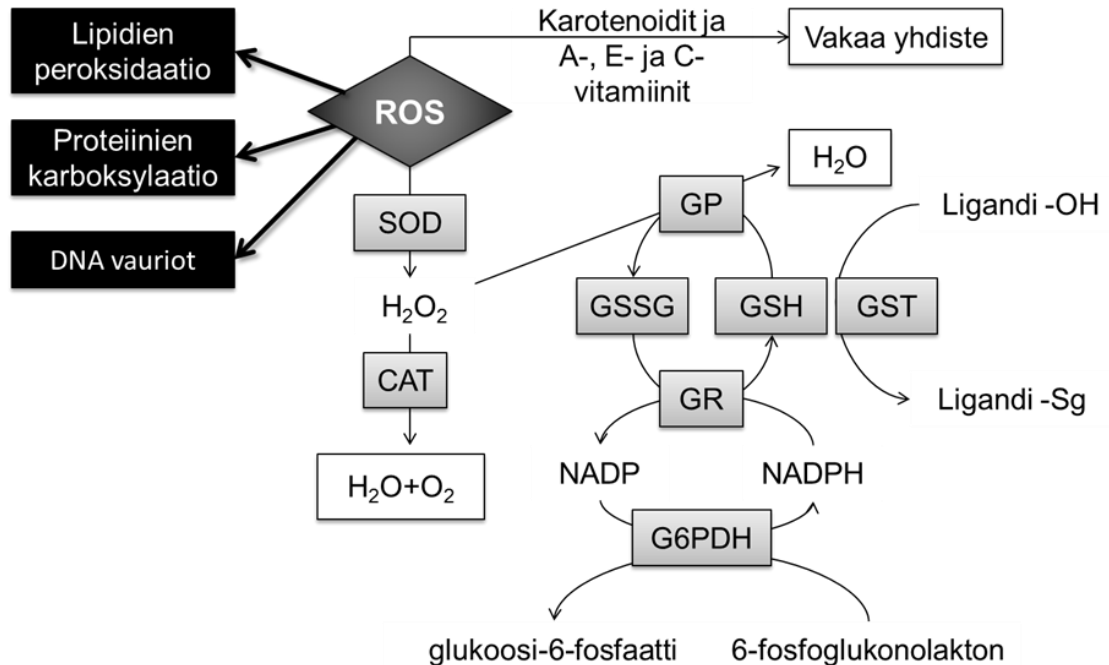
(Mueller ym. 2007)

Lukuisat entsyymaattiset ja ei-entsyymaattiset prosessit voivat muodostaa reaktiivisia happiradikaaleja eliöiden soluissa. Kaikista tärkeimpiä ovat reaktiot joita katalysoivat nikotiiniamidiadeniinin dinukleotidifosfaattioksidiaasin (NADPH:n oksidaasi), ksantiinioksidiaasin (XOR) ja myeloperoksidaasin (MPO) entsyymit. Antioksidanttien tehtävänä on estää toisten yhdisteiden hapettumista ja toimia tasapainottajina oksidatiivisen stressin aiheuttamissa reaktioissa. Aktivoituneet leukosyytit ovat suurin lähde reaktiivisten happiradikaalien muodostumiseen infektioissa, kuten verenmyrkytyksessä. Tuloksena muodostuneet reaktiiviset happiradikaalit johtavat antioksidanttien ehtymiseen ja voivat hyökätä lukemattomiin biomolekyyliin, kuten proteiineihin, lipideihin ja DNA:han (kuva 1). Reaktiiviset happiradikaalit ovat myös tärkeä tekijä solujen välisessä signaaliviestinnässä, koskien joko solujen selviytymistä tai kuolemaa. (Bayir, 2005)



Kuva 1. Reaktiivisten happiradikaalien muodostuminen (Bayir, 2005, muokattu kuva)

Kuvassa 2 on kuvattu oksidatiivisen stressin metaboliaan vaikuttavia tekijöitä. Mikäli metaboliassa muodostuu liikaa reaktiivisia happiradikaaleja, voi silloin seurauksena muodostua lipidien peroksidaatiota, proteiinien karboksylaatiota tai DNA:n vaurioita. Reaktiivisia happiradikaaleja on kuitenkin aina solutasolla jonkin verran ja elimistö kontrolloi niiden määrää karotenoideilla ja A-, E- ja C-vitamiineilla. (Mueller ym. 2007) Kuvassa 2 on myös aikaisemmin kerrottuja entsymaattisia antioksidanttipuolustusreaktioita.

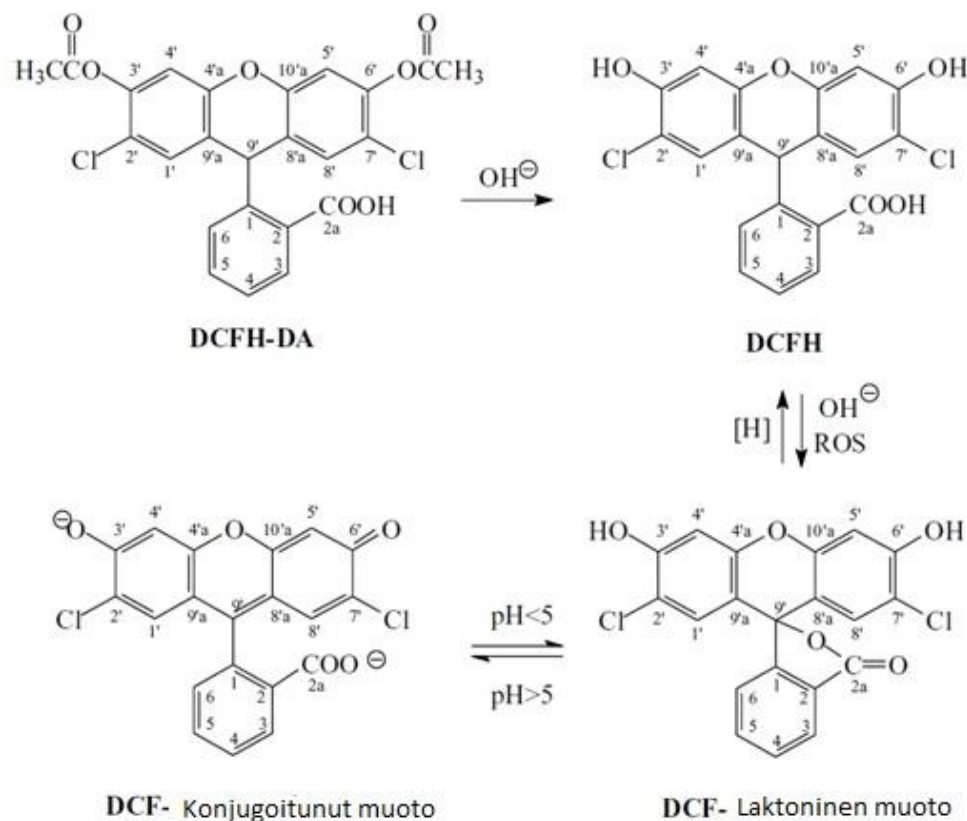


Kuva 2. Reaktiivisten happilajien aineenvaihduntareitit (Mirella Kanerva, muokattu kuva)

3. 2',7'-DIKLOORIFLUORESEIINI DIASETAATTI

2',7'-Dikloorifluoreseiini diasetaatti eli DCFH-DA (tai DCFDA) on yleisesti käytetty koetin, jota käytetään havaitsemaan reaktiivisten happiradikaalien muodostumista neutrofiileissä ja makrofaageissa. DCFH-DA:ta käytetään myös apuna arvioimaan kokonaiskuvaa oksidatiivisen stressin vaikutuksista toksikologisissa ilmiöissä. (Afri ym. 2004)

DCFH-DA menee solujen sisälle ja vaikuttaa sen jälkeen enimmäkseen sytosolissa. Sytosolissa DCFH-DA deasetyloituu esterien vaikutuksesta dikloorifluoreseiiniksi (DCFH) ja tämän jälkeen muuttuu lukuisten happiradikaalien vaikutuksesta DCF:ksi (kuva 3). DCF on mahdollista havaita mittaamalla sen fluoresenssi 525 nm paikkeilla, kun viritystila on 488 nm paikkeilla. (Halliwell & Guttridge 2007)



Kuva 3. DCFH-DA:n rakenteen muuttuminen fluoresenssimittauksissa. (Afri ym. 2004, muokattu kuva)

DCFH-DA on rakenteeltaan lipofiilinen diesteri joka sijaitsee syvällä liposomaalisessa kerroksessa, kun taas DCFH sijaitsee suhteellisen matalalla alueella. DCF on selkeästi hydrofiilisin kaikista kolmesta, mutta sen sijainti riippuu mediumin pH:sta. Happamissa olosuhteissa DCF esiintyy laktonisessa muodossa ja sijaitsee hieman DCFH:n yläpuolella, mutta on silti lipidikaksoiskerroksen sisällä. Emäksisissä oloissa DCF:n ionisoitunut muoto sijaitsee lähempänä rajapintaa (Afri ym. 2004). DCFH-DA:n eri muotojen sijainnilla ei ole merkitystä opinnäytetyössä suoritettaviin mittauksiin, vaan sillä on enemmän merkitystä kun detektoidaan tulosta ottamalla kuvia solusta esim. fluoresenssimikroskoopilla (Mirella Kanerva, henkilökohtainen tiedonanto).

DCFH-DA havaitsee solunsisäiset peroksidit hyvin, mikäli ne ovat muuttaneet muotoaan radikaaleiksi. Sytotoksisuuden välttämiseksi, DCFH-DA:ta tulisi käyttää solujen kanssa pienillä konsentraatioilla, kuten 1-10 μM / 45 min – 1 h. DCFH-DA:n korkeammat pitoisuudet tai suuri valon intensiteetti voivat aiheuttaa valokemiallisen oksidaatorakennelman fluoresenssileimattuihin tuotteisiin jotka voidaan tulkita happiradikaalien kehittymiseksi. (Halliwell & Gutteridge 2007)

4. FLUORESENSSI JA ABSORBAATIOMITTAUS

Fluoresenssissa molekyylien elektronit siirtyvät korkeampaan energiatilaan, kun molekyylit absorboivat valoa itseensä. Aine alkaa emittoida eli säteillä valoa, kun viritystila purkautuu säteilyllä, joiden aallonpituus on pitempi kuin absorboituneen valon. Absorptiospektri kutsutaan aineen absorboimaa aallonpituus-alueita ja emissiospektri aineen emittoimaa aallonpituus-alueita. (Rantala & Lounatmaa ym. 1998)

4.1 PerkinElmerin Envisionin kuoppalevyn lukija

Mittaukset tehtiin käyttäen Perkin Elmerin envision-kuoppalevynlukijaa (kuva 4).



Kuva 4. PerkinElmerin envision-kuoppalevynlukija.

4.2 Annostelija

Mittauksissa käytetään automaattista annostelijaa (kuva 5), joka lisää kuoppalevylle tarvittavat reagenssit valittuihin kuoppiin. Annostelijassa on kaksi eri pumppua, joten sillä voidaan lisätä kahta eri liuosta reaktioon.



Kuva 5. PerkinElmerin envision-kuoppalevynlukijan automatisoitu annostelija.

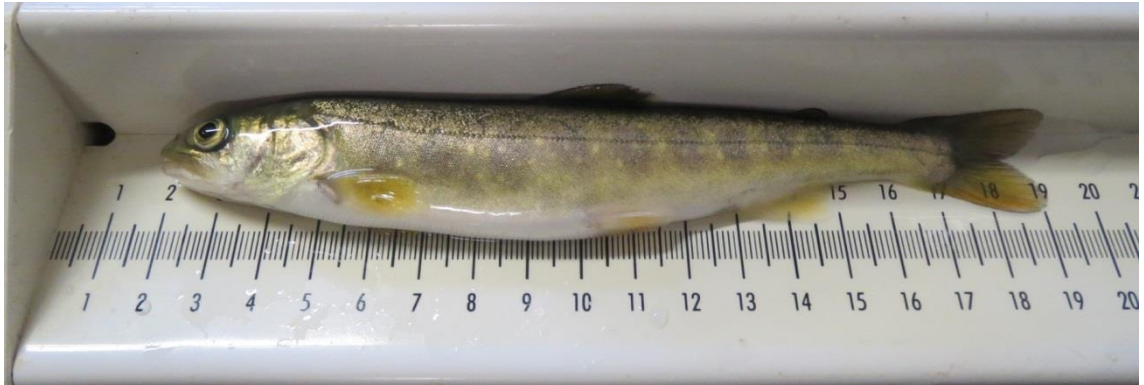
5. NÄYTTEET

Näytteinä oli työssä kahdesta eri kalalajista, lohesta (kuva 6) ja nieriästä (kuva 7) otettuja näytteitä. Ensimmäiset käsiteltävät näytteet olivat verinäytteitä moollemista kaloista ja toiset näytteet olivat näiden kalojen silmäloisia. Näytteet kerättiin Suomessa Enonkoskella sijaitsevassa kalankasvatuslaitoksella ja niitä on kasvatettu erilaisissa olosuhteissa jotta tuloksista olisi mahdollista tulkita miten olosuhteiden muutokset vaikuttavat kaloihin.

Näytteistä tutkittiin onko infektoituneilla kaloilla korkeammat tai matalammat happiradikaalipitoisuudet kuin terveillä ja vaikuttaako loisten lukumäärä tähän, koska esimerkiksi immuunipuolustuksessa saattaa vapautua reaktiivisia happiradikaaleja. Kaloista tutkittiin myös niiden antioksidanttipuolustusta, sen vaikutusta loisten lukumäärä, sekä ilmaston lämpötilan tai happipitoisuuden vaikutusta kalojen reaktiivisten happiradikaalien määrään.



Kuva 6. Kuvassa on yksi tutkimuskaloista, järvilohi, jolta otettiin näytteitä mitauksia varten. (© Mirella Kanerva)



Kuva 7. Kuvassa on yksi tutkimuskaloista, nieriä, jolta otettiin näytteitä mittauksia varten. (© Mirella Kanerva)

5.1 Verinäytteet

Kalat nukutettiin verinäytteiden ottamista varten, koska kalojen pitää olla eläviä näytteenottohetkellä. Kaloilta leikattiin pyrstö pois, jonka jälkeen niiltä imettiin kapillaarien avulla kaikki mahdollinen veri pois. Tämän jälkeen kaloilta taitettiin niskat ennen varsinaisia preparointeja. Veret laitettiin 1,5 ml:n eppendorfputkiin, jotka kuljetettiin nestetyppisäiliössä Turun Yliopistolle ja pakastettiin syväjäähäpakastimilla $-80\text{ }^{\circ}\text{C}$:een.

5.2 Silmä joka on terve tai infektoitunut silmäloisilla

Kuvissa 8 ja 9 näkee eron, millainen on kalan terve ja infektoitunut silmä kun kalalla on silmäloisia. Kuvassa 9 on yhteensä kaksi silmäloista ja ne näkyvät kuvassa pieninä, vaaleina soikion mallisina.



Kuva 8. Terve silmä. (© Mirella Kanerva)



Kuva 9. Infektoitunut silmä. (© Mirella Kanerva)

Jotta silmäloiset on mahdollista saada tutkittavaksi, on kalat jouduttu preparoimaan. Kuvassa 10 on oikealla puolella preparoitu kalansilmä ja vasemmalla puolella on kalan silmän linssiosa. Silmäloisnäytteiden haluttiin sisältävän mahdollisimman vähän linssimateriaalia, koska se olisi häirinnyt näytteiden mittauksia nostamalla fluoresenssi- ja absorbanssiarvoja mittauksissa. Linssimateriaali siis häiritsee mittauksen kemiallista reaktiota jolloin haluttua fluoresenssin tai absorbanssin muutosta ei pystytä havaitsemaan kunnolla.



Kuva 10. Preparoidut kalan silmät. (© Mirella Kanerva)

5.3 Koejärjestelyt

Taulukossa 1 on esitetty kummallekin lajille tehdyt koejärjestelyt. Molemmista lajeista oli noin 30 tervettä ja 30 infektoitunutta kalaa samassa altaassa:

Taulukko 1. Lohikalojen koejärjestelyt.

Veden lämpötila (°C)	Hapetus	Hypoksia	Kalat	
14 °C	Jatkuva	Ei	Puolet terveitä	Puolet infektoituneita
8 °C	Jatkuva	Ei	Puolet terveitä	Puolet infektoituneita
14 °C	Aamulla päälle	Yöt	Puolet terveitä	Puolet infektoituneita
8 °C	Aamulla päälle	Yöt	Puolet terveitä	Puolet infektoituneita

Lämpötilan nostolla haluttiin nähdä minkälaisia vaikutuksia ilmaston lämpenemisellä tai lämpimillä kesillä on kaloihin. Lämpötilan nousulla on havaittu olevan suurempi vaikutus silmäloisten määrään kaloilla. (Mirella Kanerva, henkilökohtainen tiedonanto)

Hypoksia annettiin öisin pitämällä kuplamuovia kalatankin päällä. Hypoksian avulla haluttiin selvittää miten kalat reagoivat veteen, jossa happipitoisuus alkaa laskea. Vastaavanlaista happipitoisuuden laskua on havaittavissa erityisesti rehevöityneissä järvissä. (Mirella Kanerva, henkilökohtainen tiedonanto)

6. REAKTIIVISTEN HAPPIRADIKAALIEN MITTAUKSEN OPTIMOINTI

Työssä on tarkoituksena optimoida parhaimmat olosuhteet ROS-mittaukselle, joten työssä vertailtiin keskenään eri aineiden vaikutuksia toisiinsa. Optimoinnin kohteena olivat:

- verikonsentraatio
- DCFH-DA:n konsentraatio
- standardin valitseminen
- standardipisteet
- standardin konsentraatio
- sisäinen standardi
- inkubaatiolämpötila
- mittauksen toistettavuus

6.1 Verikonsentraatio

Verinäytteiden konsentraatioiden vaihtoehtoina olivat 0,25 : 0,5 : 1 ja 2 mg/ml puskuriin laimennettuna (100 mM K-fosfaatti + 150 mM KCl puskuri). Oikean verikonsentraation löytämiseksi päätimme vertailla eri verinäytteiden konsentraatioiden tuloksia erilaisilla kuvaajilla ja havaita mahdollisesti muodostuvia trendejä. Kuoppalevy sijoitetaan pipetoinnin ajaksi myös jäille, jotta verinäytteet eivät kärsisi lämpötilan muutoksesta niin paljon koska se voi vaikuttaa lopputulokseen negatiivisella tavalla.

6.2 DCFH-DA:n konsentraatio

DCFH-DA:n konsentraation vaihtoehtoina olivat 0,55 : 1,1 ja 2,2 μM . Oikean DCFH-DA:n konsentraation löytämiseksi päätimme vertailla eri DCFH-DA:n

konsentraatioiden tuloksia erilaisilla kuvaajilla ja havaita mahdollisesti muodostuvia trendejä.

Mikäli reaktiossa on liian vähän DCFH-DA:ta, niin silloin sitä ei ole tarpeeksi sitoutumaan kaikkiin mahdollisiin vapaisiin happiradikaaleihin joita reaktiossa mahdollisesti olisi. Jos taas reaktiossa on liikaa DCFH-DA:ta, voi silloin ylimääräinen DCFH-DA sitoutua epäspesifisesti myös mahdollisesti muihin kuin vapaisiin happiradikaaleihin. (Mirella Kanerva, henkilökohtainen tiedonanto)

6.3 Standardin valitseminen

Standardien vaihtoehtoina olivat joko kumene, vetyperoksidi tai tert-butyylihydroperoksidi, joista tarvitsisi selvittää parhaiten toimiva standardi ROS-mittauksiin. Tarkoituksena oli löytää jokaisen standardin optimikonsentraatioalue, jotta voitaisiin päätyä valitsemaan oikea standardi. Standardin konsentraatio vaikutti standardin valintaan, koska liian pienellä tai liian suurella pitoisuudella reaktio ei välttämättä tapahtuisi parhaalla mahdollisella tavalla.

6.4 Standardipisteet

Standardipisteiden kokeilussa haluttiin selvittää olisiko se parempi vaihtoehto kuin sisäinen standardi. Mikäli standardipisteet valittaisiin, ne tehtäisiin ilman verinäytteitä, pelkkä valittu standardi vertailuna.

6.5 Standardin konsentraatio

Standardin konsentraation valinnassa valittiin jokaiselle eri standardivaihtoehdolle oma konsentraation alue, josta parhaimman valinta tulisi selville vertailemalla eri standardien konsentraatioiden tuloksia keskenään kuvaajilla. Näistä kuvaajista etsittiin erilaisia mahdollisia trendejä.

6.6 Sisäinen standardi

Sisäisen standardin ideana olisi mahdollisesti muuttaa DCFH-DA:n fluoresenssitasoa ensimmäisen mittauksen jälkeen. Tällöin tuloksen tulee olla positiivinen ja korkeampi kuin pelkän verinäytteen ja DCFH-DA:n tulos, koska sisäistä standardia lisättäisiin näytteisiin viimeiseksi. Mikäli tulos on negatiivinen, silloin sisäinen standardi ei ole vaikuttanut halutulla tavalla reaktioon. Tuloksen korkeudella ei ole niin väliä kunhan se korreloi sisäisen standardin konsentraation kanssa. Mitä korkeampi konsentraatio sitä korkeampi pitäisi fluoresenssituloksen olla. Pääasia on että tulos on koneen detektioalueella.

6.7 Inkubaatiolämpötila

Inkubaatiolämpötilan vaihtoehtoina olivat 25 ° ja 32 °C:ta. Lämpötilan valinta määräytyy siitä, kummalla lämpötilalla valittu standardi antaa paremmat tulokset.

6.8 Mittauksen toistettavuus

Mittauksen toistettavuutta on tarkoitus vertailla eri päivinä tehtyjen mittausten ja niiden tuloksista piirrettyjen pylväsdiagrammien avulla. Pylväsdiagrammien tulkinnassa halutaan nähdä muodostuuko mittaustuloksista samanlaista trendiä ja poikkeavatko tulokset samojen näytteiden välillä. Mikäli pylväsdiagrammeissa on havaittavissa selvä trendi ja samojen näytteiden tulokset ovat lähellä toisiinsa, voidaan mittaus todeta toistettavaksi.

7. SILMÄLOISTEN NÄYTEMATRIISIN OPTIMOIMINEN

Kyseisiin mittauksiin on jo olemassa validoidut antioksidanttimitausmenetelmät (Liite 1), mutta kyseistä menetelmää ei ole aikaisemmin sovellettu silmälois näytteiden mittaukseen. Näytematriisin optimoimiseen tuo haastetta näytematriisin pieni koko, jolloin näytteen laimennoksessa tulee huomioida näytteen proteiinipitoisuus. Proteiinimääritys tehdään siis ensin, jotta pystytään määrittämään näytteiden oikeanlaiset pitoisuudet jatkomäärityksiin.

Seuraavana määritykset jotka mitataan silmäloisnäytteillä, mikäli menetelmät toimivat oikein uudella näytematriisilla:

- Proteiinimittaus
- GP
- GR
- GSH-GSSG
- SOD
- CAT
- GST
- G6PDH

7.1 Näytteen käsittely

Näytteet homogenisoitiin homogenisaattorilla (kuva 11) liuottamalla ne 100 mM K-fosfaatti + 150 mM KCl pH 7,4 puskuriin. Tämän jälkeen otetaan kuulat pois ja sentrifugoidaan 15 min / 10 000 rpm / 4 °C:ssa. Supernatantti jaetaan niin moneen uuteen putkeen, kuinka monta määritystä niistä ollaan tekemässä ja pakastetaan ensin nestetyypen kautta. GSH-GSSG:n määritystä varten putkiin lisätään 5 % sulfosalisyylihappoa ja sentrifugoidaan uudestaan 10 min / 10 000 rpm / 4 °C:ssa. Supernatantti otetaan talteen lopullista GSH-GSSG:n määritystä varten.



Kuva 11. Homogenisointilaitteisto.

8. TULOKSET / ROS-MITTAUS

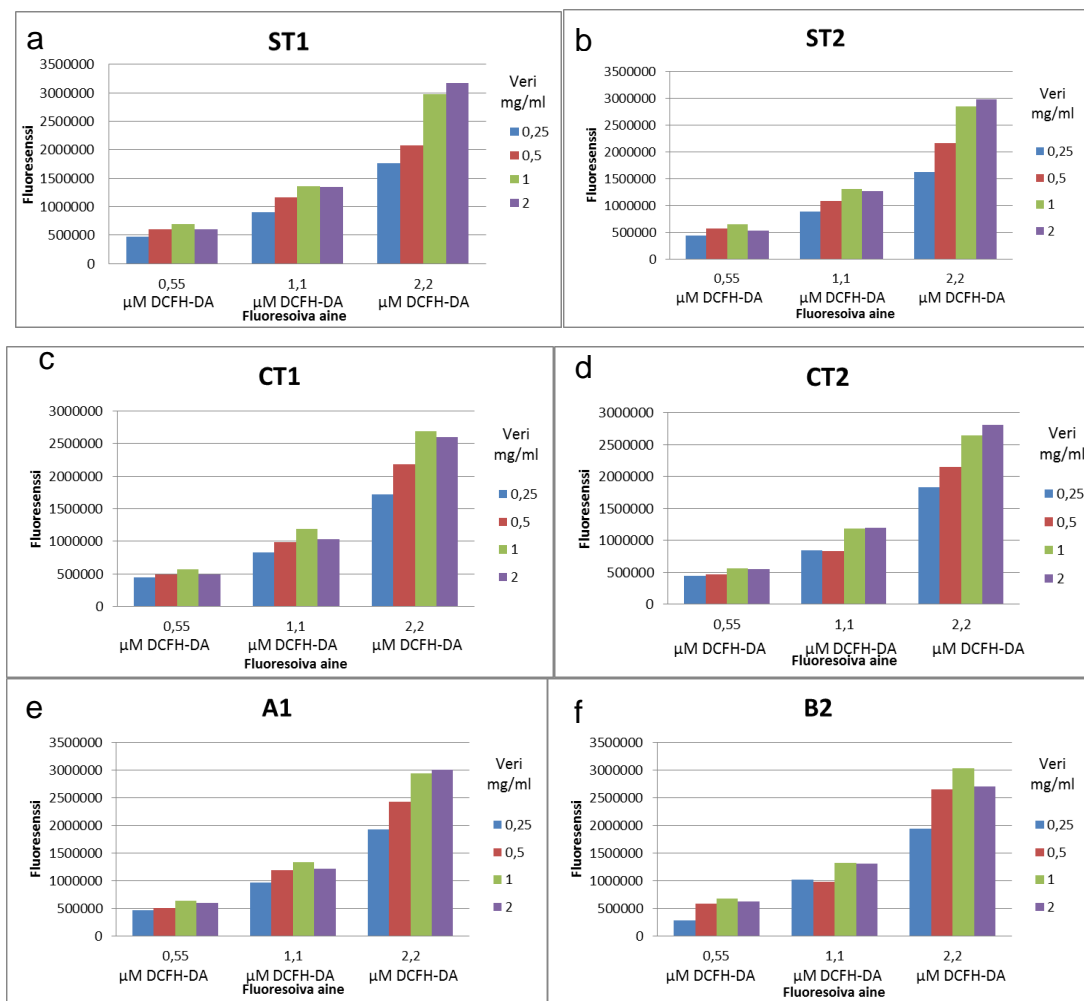
8.1 ROS-mittaus

8.1.1 Verinäytteen konsentraatio

Kuviossa 1 (a-f) verrataan mikä on paras laimennos verinäytteille. Verinäytteiden laimennokset ovat 0,25 : 0,5 : 1 : 2 mg/ml. Veri -tai DCFH-DA:n pitoisuuden noustessa myös fluoresenssin tuloksen kuuluu nousta, mikä on myös havaittavissa kuviossa 1 (a-f), siten että 0,25 : 0,5 ja 1 mg/ml fluoresenssin tulokset kasvavat tasaisesti.

Mikäli veripitoisuuden konsentraatio nousee liian korkeaksi, ei reaktio enää tapahdu samalla tavalla kuin aikaisemmin. Reaktiossa on tällöin liikaa reaktiivisia happiradikaaleja, jolloin DCFH-DA:ta ei riitä sitoutumaan kaikkiin happiradikaaleihin. Tämän seurauksesta reaktio tapahtuu epäspesifisesti, koska reaktiosta ei tämän takia ole mahdollista saada signaalia. 2 mg/ml verinäytteet ovat täten liian vahvoja konsentraatioiltaan, koska 2 mg/ml verinäytteet jäävät melkein aina 1 mg/ml verinäytteiden laimennoksien tuloksia pienemmiksi tai ovat niiden kanssa samoissa, joka selittyy juuri epäspesifisellä sitoutumisella. Ratkaisuna voisi teoriassa olla DCFH-DA:n konsentraation nosto, mutta sillä ei tunnu olevan toivottua vaikutusta, joka taas viittaisi siihen että liian suurella konsentraatiolla veri aiheuttaa myös muunlaista inhibitiota reaktiossa.

Parhain verinäytteen konsentraatioksi olisi 1 mg/ml, koska se antaa korkeimmat tulokset kuin 0,25 tai 0,5 mg/ml konsentraatioiden fluoresenssitulokset.



Kuvio 1. (a-f) Verinäytteiden tulokset eri pitoisuuksilla. Näytteiden lyhenteitä ovat ST1 & ST2 (lohesta peräisin olevat näytteet), CT1 & CT2 (nieriästä peräisin olevat näytteet) ja A1 & B2 (joko lohesta tai nieriästä peräisin olevat näytteet).

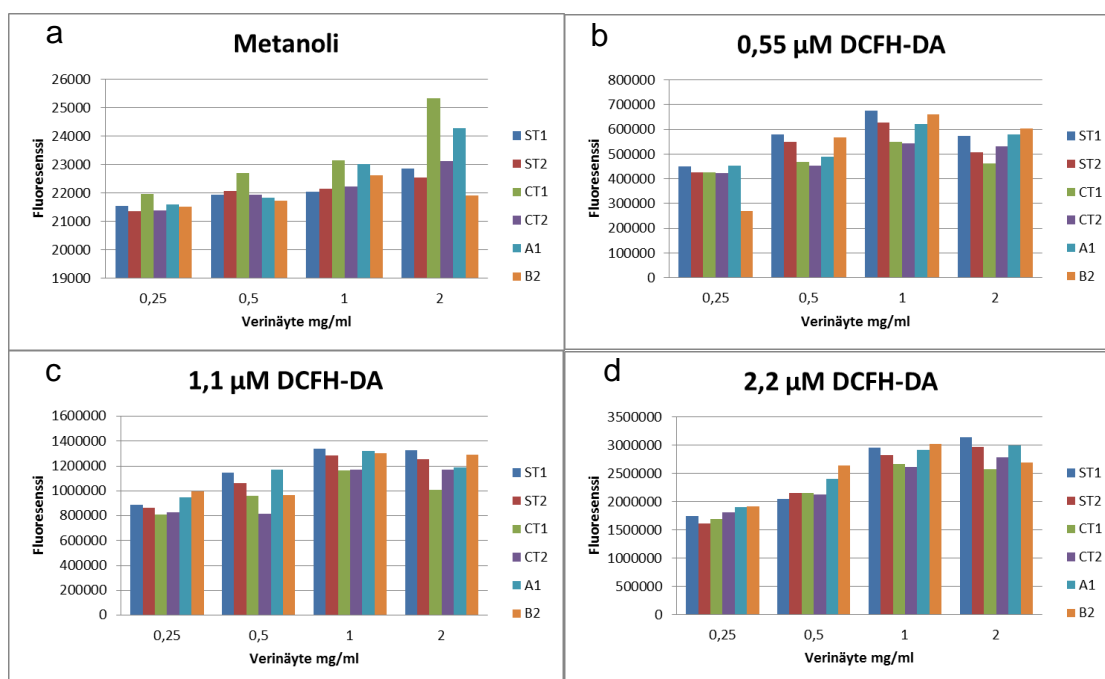
8.1.2 DCFH-DA:n konsentraatio

Kuviosta 2 (a-d) verrataan miten nollanäyte ja DCFH-DA:n laimennokset 0,55 : 1,1 : 2,2 μM vaikuttavat eri verinäytteiden laimennoksiin. Verinäytteiden laimennokset ovat 0,25 : 0,5 : 1 : 2 mg/ml.

Yleisesti katsottuna tulokset nousevat 0,25 → 2 mg/ml mentäessä, niin kuin laimeimmasta vahvempaan kuuluukin mennä. Tämä kertoo siitä, että veren laimennokset on tehty oikein ja että mahdollisilta pipetointivirheilä on välttytty.

Kuvion 2 (b-d) tuloksista on jo vähennetty nollanäyte eli veren oma fluoresenssi (pelkkä metanoli) jolloin tulokset kertovat suoraan reaktiivisten happiradikaalien fluoresenssin.

ST1 näytteet ovat tuloksiltaan aina korkeammat ja CT1 näytteet ovat aina matalimmat 1,1 ja 0,55 μM DCFH-DA:n pitoisuuksilla, kun taas 2,2 μM DCFH-DA:n pitoisuuksilla näin ei ole. Tämän takia 2,2 μM DCFH-DA:n laimennos on huonoin vaihtoehto näistä kolmesta, koska siinä näytteiden kuvio ei toistu samana eri verikonsentraatioilla. Verrattuna 1,1 μM ja 0,55 μM DCFH-DA:n laimennoksia keskenään, molemmat ovat hyvin samankaltaisia. 0,55 μM DCFH-DA:n laimennos vaikuttaisi olevan paras vaihtoehto kaikista kolmesta, koska siinä toistuu samanlainen kuvio koko ajan verrattuna muihin DCFH-DA:n laimennoksiin. Kaikilla verikonsentraatioilla on kuitenkin hyvin samanlaiset ryhmittymät.

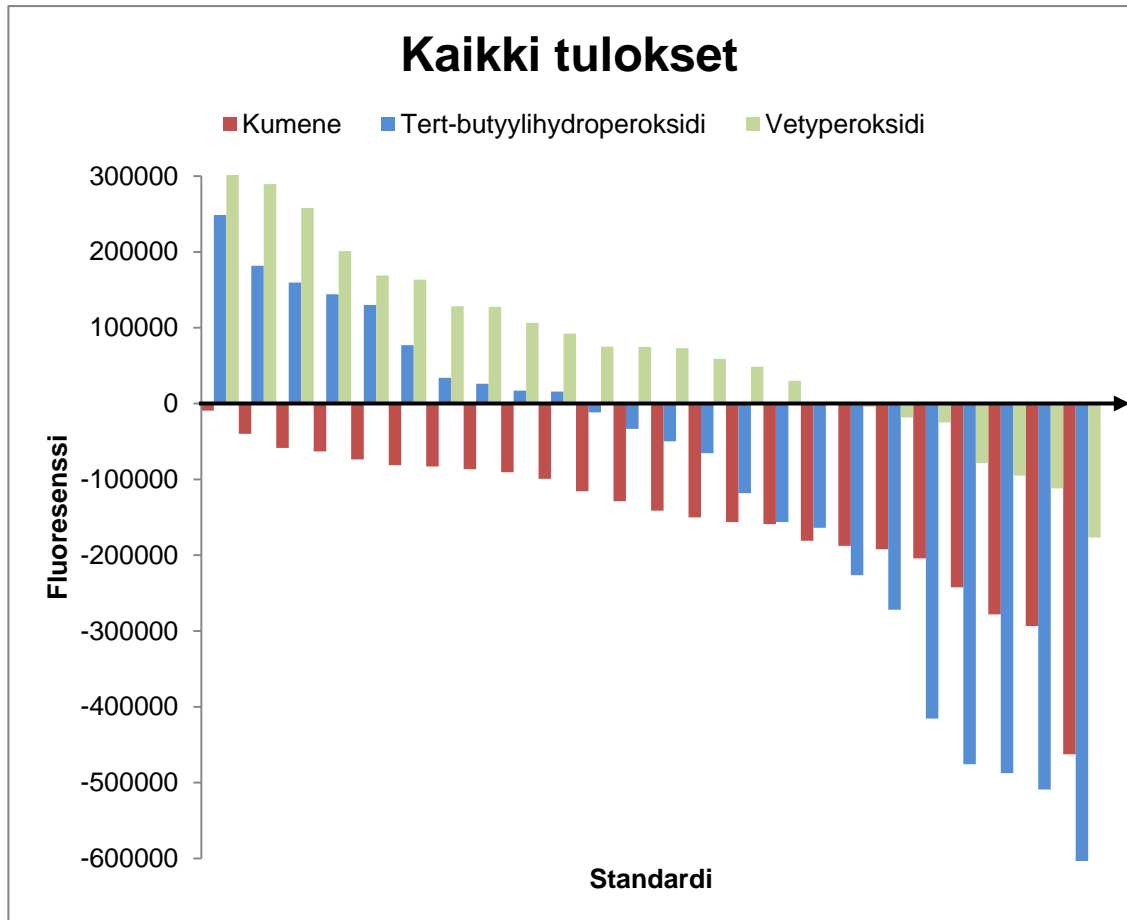


Kuvio 2. a-d. DCFH-DA:n vaikutus eri näytepitoisuuksiin.

8.1.3 Standardin valinta

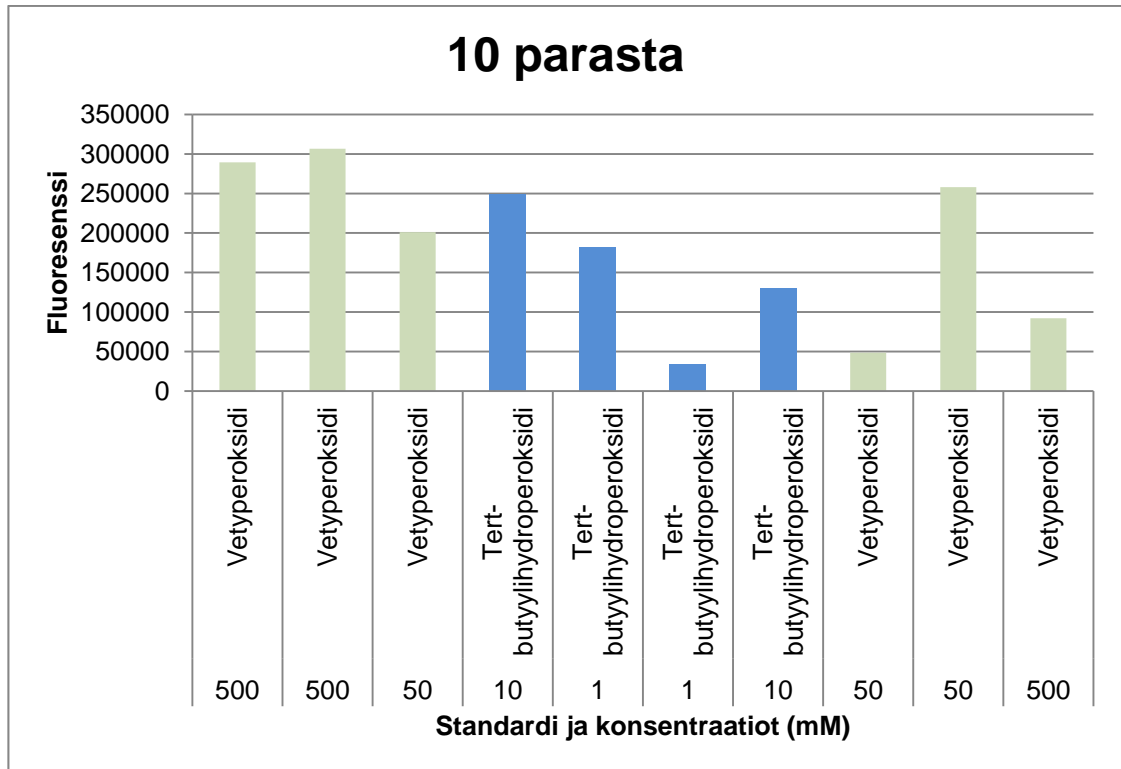
Kuviosta 3 verrataan millä standardilla saa enemmän parempia eli korkeampia, positiivisia arvoja ja millä standardilla tulee eniten huonoja eli negatiivisia arvoja.

Eniten positiivisia tuloksia antaa vetyperoksidi ja eniten negatiivisia tuloksia kumene.

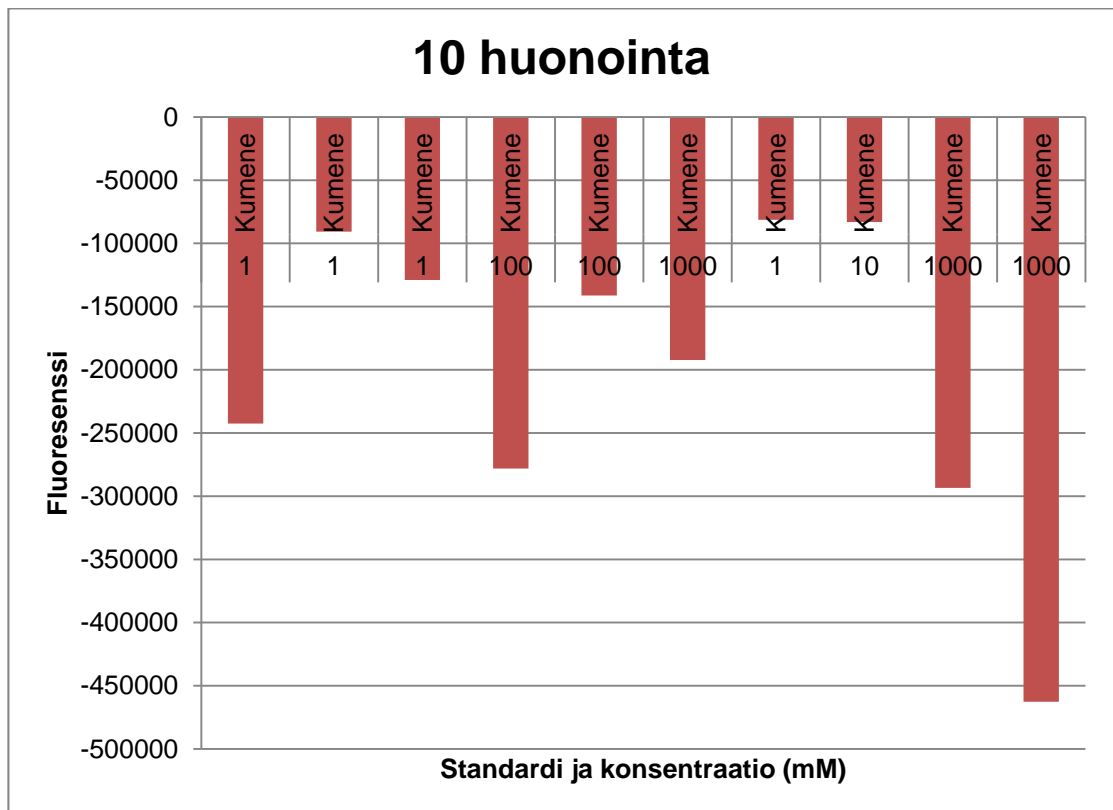


Kuvio 3. Standardien positiiviset ja negatiiviset tulokset.

Kuviossa 4 verrataan 10 positiivisinta tulosta, josta selviää sekä standardi että standardin pitoisuus. Kuviossa 5 verrataan 10 negatiivisinta standardia että standardin pitoisuutta. Vetyperoksidin 50 ja 500 mM ja tert-butyylihydroperoksidin 1 ja 10 mM ovat parhaimpien joukossa, kun taas kumenen 1, 100 ja 1000 mM antoivat huonoimpia tuloksia.



Kuvio 4. Parhaimmat standardit ja standardin laimennokset.



Kuvio 5. Huonoimmat standardit ja standardin laimennokset.

Koska kumenen tulokset olivat paljon huonommat kuin vetyperoksidin ja tert-butyylihydroperoksidin, päätettiin siitä tehdä uusi laimennossarja ja käyttää metanolin sijasta H₂O:ta laimentamiseen. Tämä sen takia koska epäilimme tulosten olevan alhaisia siksi että metanolia pipetoitava määrä on hyvin pieni ja arvelimme sitä haihtuvan liikaa ennen itse mittausta. Kumenen laimennossarjaa pyrittiin myös suojaamaan paremmin valolta koko työn aikana. Kumenen uusi laimennossarja:

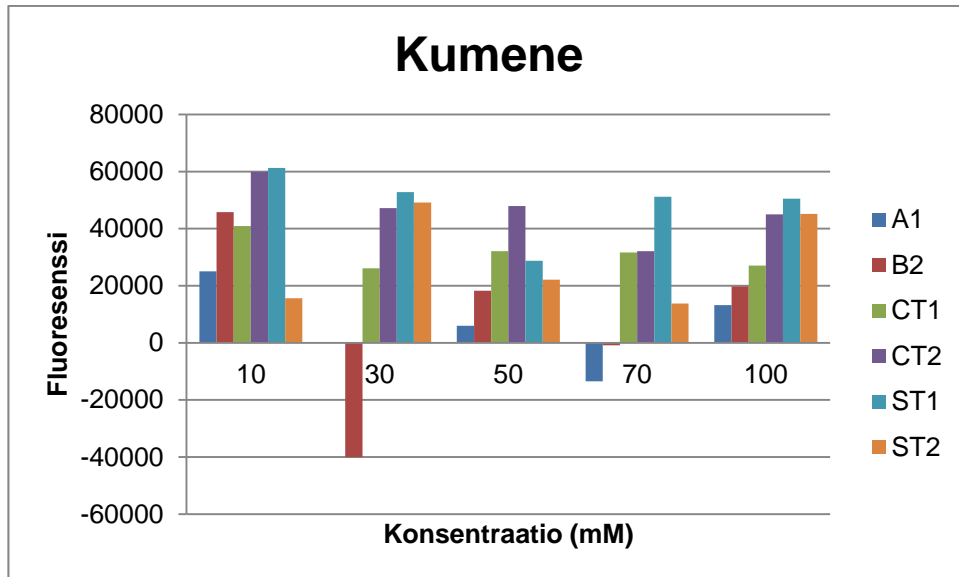


Näytteiden tulokset eivät olleet poikkeavia verrattuna siihen käytettiinkö metanolia vai vettä kumenen laimentamiseen. Tulokset (taulukossa 2) heittelivät edelleen ja yksikään kumenen laimennoksista ei erottunut edukseen muista.

Taulukko 2. Kumenen eri pitoisuuksien positiiviset ja negatiiviset lukumäärät.

	Kumene							
Laimennos	0,1 µM	1 µM	10 µM	100 µM	1 mM	10 mM	100 mM	1 M
Positiivinen (kpl)	2	5	4	4	4	5	3	3
Negatiivinen (kpl)	4	1	2	2	2	1	3	3

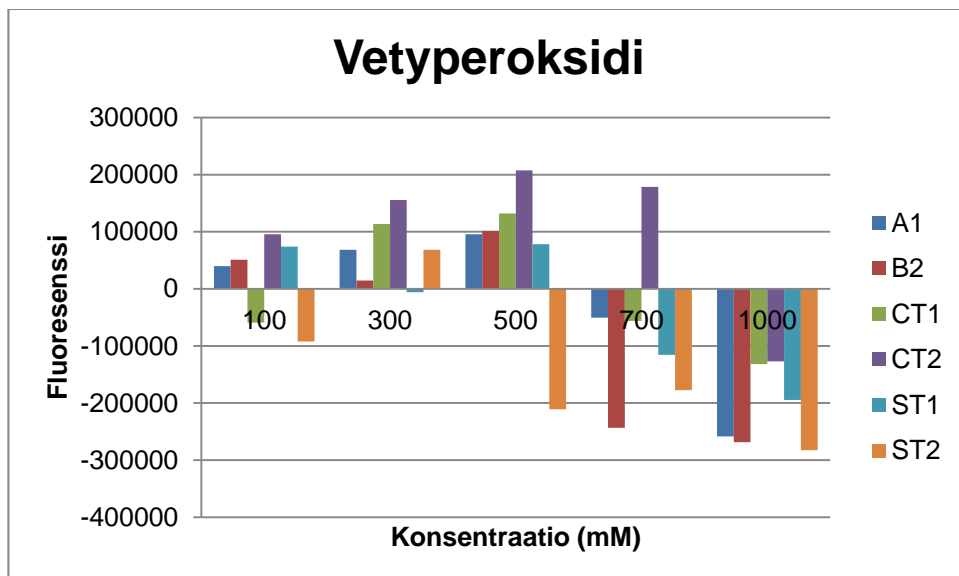
Kumenea käytettäessä standardina (kuvio 6), ei tuloksissa ole havaittavissa minkäänlaista trendiä ja fluoresenssiarvot ovat alemmat kuin käyttämällä vetyperoksidia tai tert-butyylihydroperoksidia. Kumenen tulokset ovat myös liian taseisia, koska pylväiden välillä ei ole havaittavissa vaihtelevuutta. Mittauksia jatketaan vetyperoksidilla ja tert-butyylihydroperoksidilla.



Kuvio 6. Kumenen eri konsentraatioiden tulokset.

Seuraavaksi teimme uudet laimennossarjat, vetyperoksidille 100,300,500,700 ja 1000 mM ja tert-butyylhydroperoksidille 1,3,5,7,10 mM, joilla halusimme vertailla kumpi näistä standardeista olisi parempi vaihtoehto.

Vetyperoksidin tuloksissa on (kuvio 7) havaittavissa trendin muodostuminen ja se, että yli 500 mM:n konsentraatiot ovat liian suuria pitoisuuksiltaan tähän mitaukseen eivätkä anna oikeanlaista tulosta.



Kuvio 7. Vetyperoksidin eri konsentraatioiden tulokset.

Vetyperoksidin pitoisuutta piti laimentaa, koska suuremmilla pitoisuuksilla (500-1000 mM) tapahtui kuoppalevyllä jokin reaktio, sillä kuoppiin oli ilmestynyt paljon ilmakuplia, jotka vaikuttivat tuloksiin alentavasti. Tämän takia vetyperoksidista tehtiin uusi laimennossarja, 50 : 100 : 200 ja 300 mM.

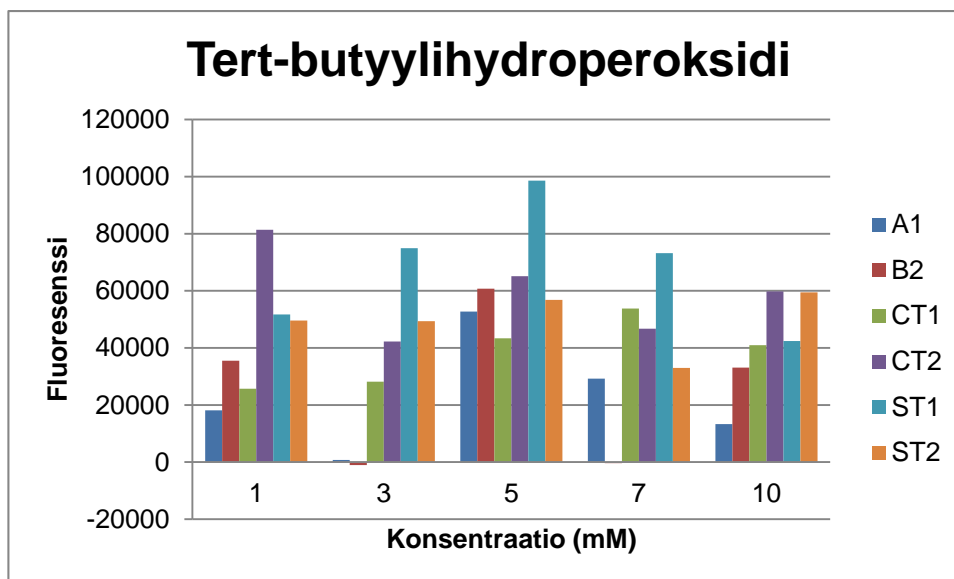
Vetyperoksidin tuloksia tarkasteltaessa huomattiin, että kuvaajalla ei saa selkeää kuvaa mitkä vetyperoksidin laimennoksista olisivat parhaimpia jatkokäsittelyyn. Taulukossa 3 olevien tulosten perusteella valittiin jatkoon 50 ja 200 mM vetyperoksidin pitoisuudet, koska niillä oli kaikista pienin hajonta tuloksissa.

Taulukko 3. Vetyperoksidin pitoisuuksien vertailu hajonnan perusteella.

Pitoisuus	Standardi	Sisäisen standardin nostama tulos	Hajonta	Keskiarvo
50	Vetyperoksidi	28584	19605,39	54217,25
50	Vetyperoksidi	69436,5		
50	Vetyperoksidi	63576		
50	Vetyperoksidi	65574		
50	Vetyperoksidi	29527,5		
50	Vetyperoksidi	68605,5		
100	Vetyperoksidi	148294	32206,22	91527,66667
100	Vetyperoksidi	59737,5		
100	Vetyperoksidi	101071		
100	Vetyperoksidi	95104,5		
100	Vetyperoksidi	64617		
100	Vetyperoksidi	80342		
200	Vetyperoksidi	111708	17806,14	94030,91667
200	Vetyperoksidi	63345		
200	Vetyperoksidi	108897		
200	Vetyperoksidi	93010,5		
200	Vetyperoksidi	86237		
200	Vetyperoksidi	100988		
300	Vetyperoksidi	82068	30012,33	76219,25
300	Vetyperoksidi	63545		
300	Vetyperoksidi	88857		
300	Vetyperoksidi	21777,5		
300	Vetyperoksidi	101722,5		
300	Vetyperoksidi	99345,5		

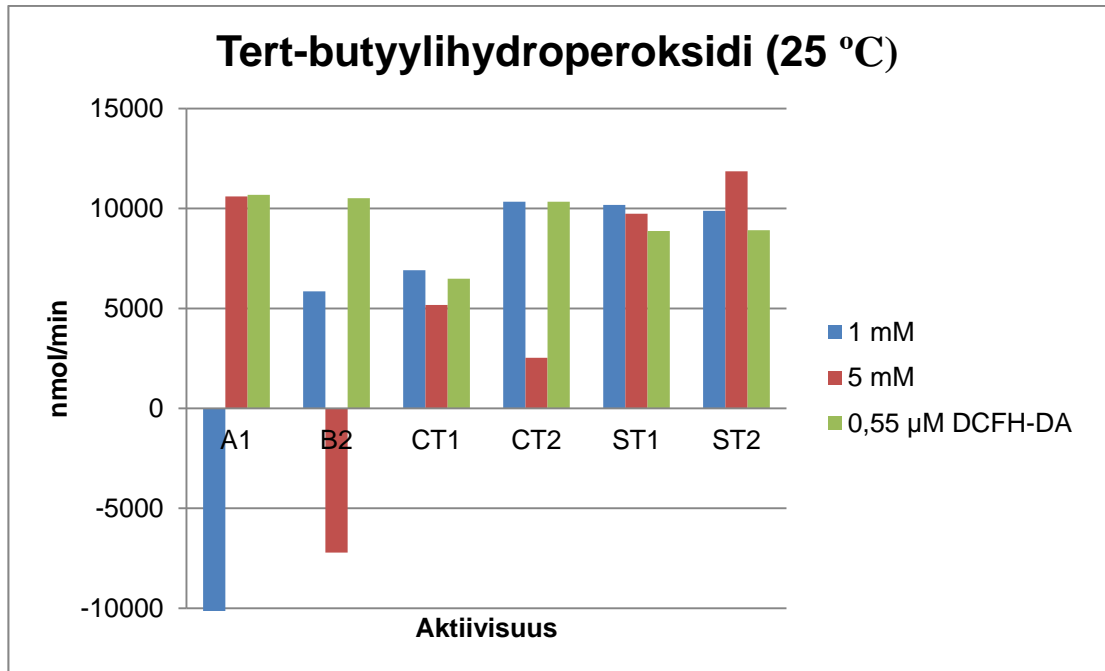
Tert-butyylhydroperoksidin kuviosta 8 erottuu että konsentraatiot 7 ja 10 ovat liian vahvoja, koska tarkasteltaessa näytteitä yksikerrallaan, näytteiden fluoresenssiarvot alkavat laskemaan tultaessa näihin konsentraatioarvoihin. Jatkoon valitaan mahdollisimman tasaiset tulokset, joissa näytteiden fluoresenssi tulok-

set nousevat tasaisesti, koska konsentraatiotkin nousevat tasaisesti. Jatkomittauksiin pääsevät 1 ja 5 mM:n konsentraatiot.

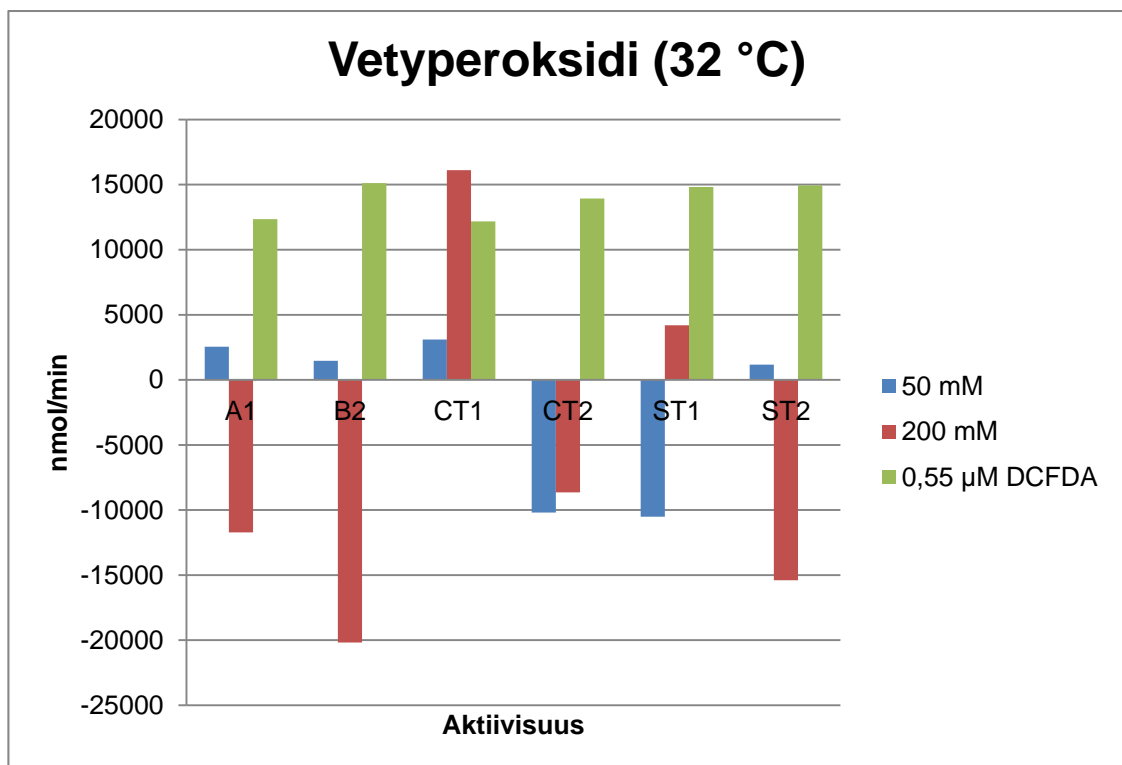


Kuvio 8. Tert-butyylhydroperoksidin konsentraatioiden eri tulokset.

Mittauksia jatkettiin 50 ja 200 mM vetyperoksidiilla ja 1 ja 5 mM tert-butyylhydroperoksidiilla. Mittaus suoritettiin kokeilemalla myös lämpötilan muutosta 25 °C:sta 32 °C:seen, mutta havaitsimme mittauksen jälkeen uuden ongelman. Kuvioissa 9 ja 10 on mahdollista havaita, että 0,55 µM DCFH-DA:n tulos korkeampi kuin näytteiden tulos joihin oli lisätty sisäistä standardia. Tästä on mahdollista päätellä, että reaktio ei ole saanut tarpeeksi aikaa tapahtuakseen. Tämä johtuu siitä, että aikaisemmissa kokeilussa sisäinen standardi pipetoitiin käsin, mikä oli hitaampaa kuin tällä kertaa, koska laite automatisoitiin pipetoimaan sisäinen standardi. Tämän takia seuraavassa mittauksessa laitteen ohjelmistoon lisätään pieni 5 minuutin odotus (arvioitu aika mikä meni käsin pipetoimiseen).

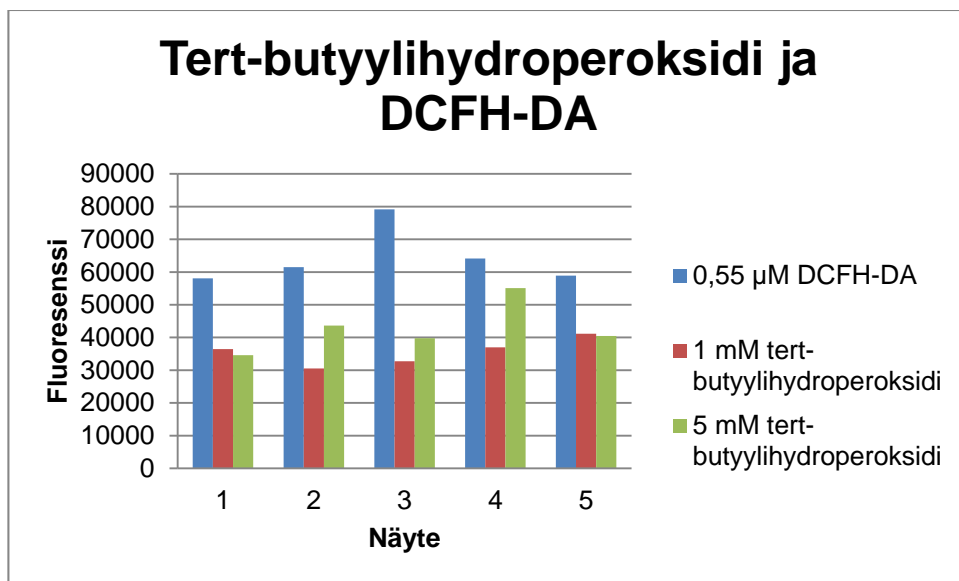


Kuvio 9. 1 ja 5 mM Tert-butyylhydroperoksidin aktiivisuuden tulokset 25°C:ssa.

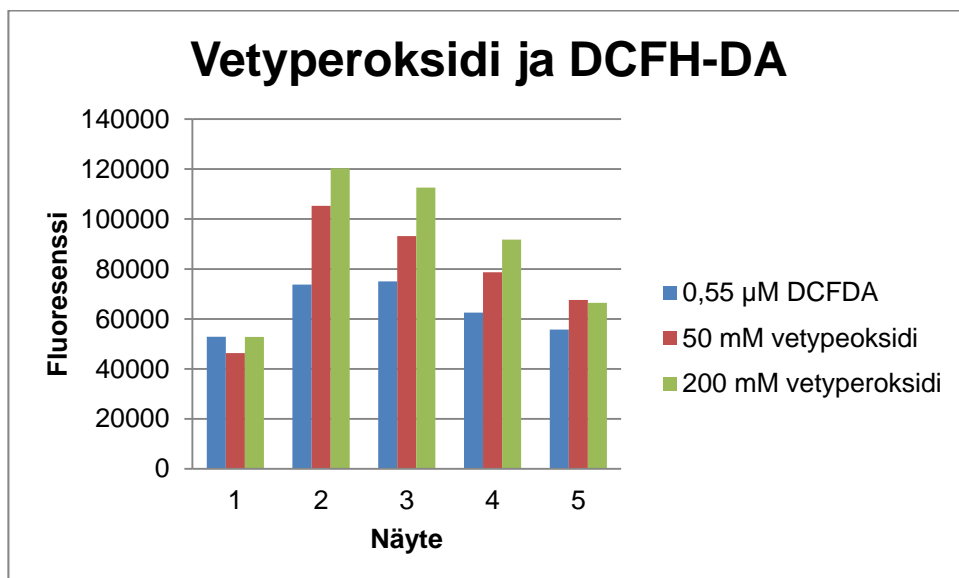


Kuvio 10. 50 ja 100 mM vetyperoksidien aktiivisuuden tulokset 32 °C:ssa.

Vetyperoksidi vaikuttaa paremmalta ratkaisulta standardiksi kuin tert-butyylhydroperoksidi (kuviot 11 ja 12). Kuviossa 12 voi selkeästi huomata että 0,55 μM DCFH-DA tulos on alhaisin koska siihen ei ole lisätty fluoresenssiarvoa nostavaa standardia. Seuraavana on 50 mM vetyperoksidin tulos ja korkeimpana on 200 mM vetyperoksidin tulos niin kuin kuulukin olla, koska 200 mM vetyperoksidissa on enemmän fluoresenssia nostavaa ainetta. Kuviossa 12 on myös havaittavissa selkeä trendi.



Kuvio 11. Tert-butyylhydroperoksidin ja DCFH-DA:n tulokset.



Kuvio 12. Vetyperoksidin ja DCFH-DA:n tulokset.

8.1.4 Standardin pitoisuus

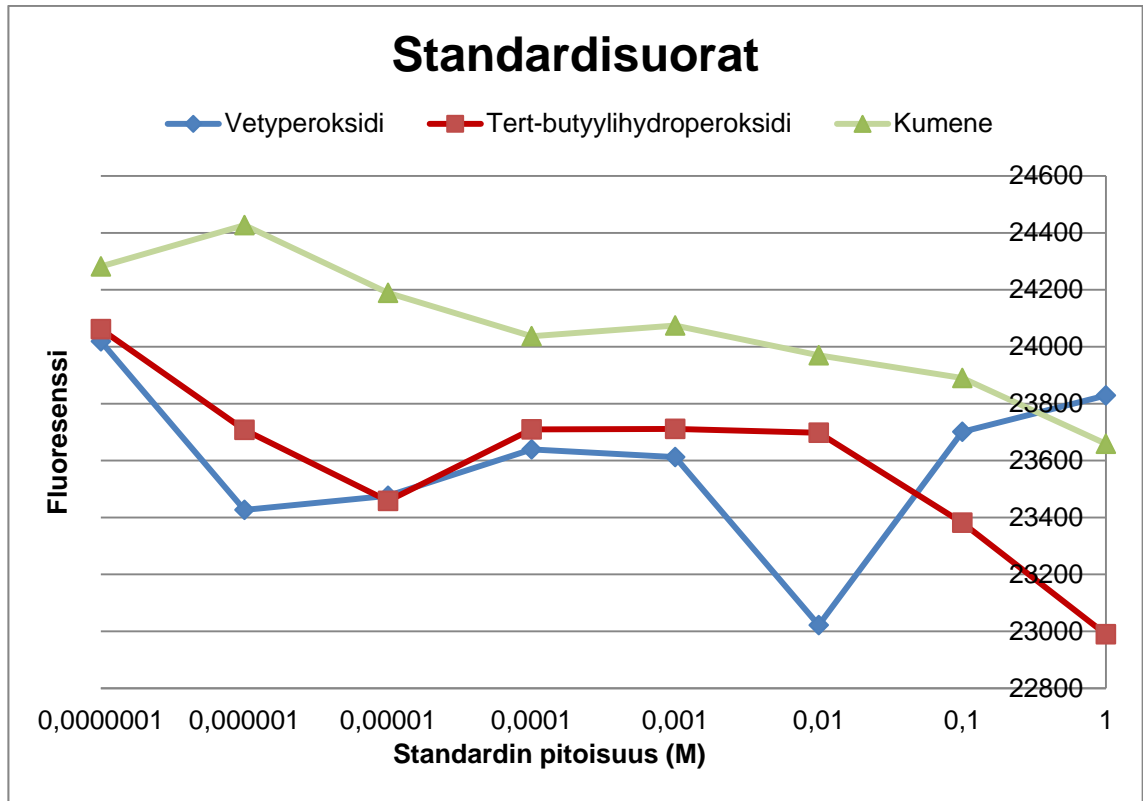
Edellinen mittaus onnistui paljon paremmin, koska 5 minuutin odotus ohjelmassa auttoi siihen että reaktiot ehtivät tapahtua. Tulosten perusteella 50 mM vetyperoksidin oli parempi vaihtoehto standardiksi kuin tert-butyylhydroperoksidi. Kuviossa 12 on mahdollista havaita, että näytteet joissa on pelkästään DCFH-DA:ta, arvot ovat nyt alemmat mitä näytteiden joihin on lisätty vetyperoksidiä. Kuvioista 12 huomaa myös miten samankaltaiset 50 mM ja 200 mM vetyperoksidien tulokset ovat. 50 mM vetyperoksidin laimennos oli kuitenkin lopullinen valinta, koska se vaikutti hieman paremmalta kuin 200 mM vetyperoksidi ja hajonnan (taulukko 4) perusteella, tuloksissa ei ollut paljon eroa.

Taulukko 4. Eri vahvuisten vetyperoksidikonsentraatioiden hajonnat.

Näyte	50 mM H ₂ O ₂	200 mM H ₂ O ₂
Hajonta	0,29 nmol/min	0,33 nmol/min

8.1.5 Standardipisteet

Pelkillä standardeilla tehty standardisuora ilman verinäytteitä ei toiminut (kuvio 13) eikä tulos myöskään edennyt logaritmisesti.



Kuvio 13. Jokaisen standardivaihtoehdon standardisuora.

8.1.6 Sisäinen standardi

Sisäinen standardi toimi paremmin kuin standardipisteet, koska tulokset olivat korkeampia sisäisen standardin lisäyksen jälkeen (kuviot 12).

8.1.7 Inkubaatiolämpötila

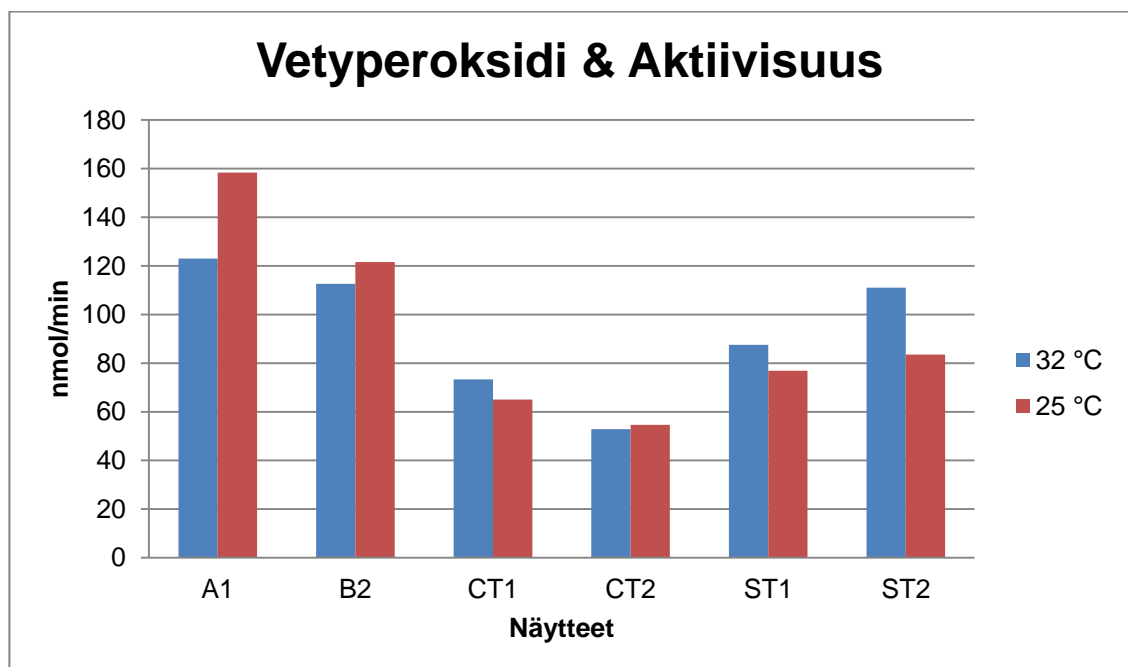
Lämpötilaa muuttamalla 25 °C:sta 32 °C:seen selkeytti kumpi lämpötila sopii paremmin tietyille standardille. Tert-butyylhydroperoksidi antoi parhaimmat tuloksensa 25 °C:ssa ja vetyperoksidi 32 °C:ssa.

8.1.8 Lämpötila ja aktiivisuus

50 mM vetyperoksidi osoittautui parhaimmaksi vaihtoehdoksi kuin muut vaihtoehdot joten seuraavassa mittauksessa annostelija automatisoitiin annostelemaan 0,55 μM DCFH-DA:n ja 50 mM vetyperoksidin automaattisesti kuoppalelylle. Tällöin käsin pipetoitavaksi jäävät verinäytteet ja metanolin nollanäyte. Testaus tehdään myös 25 °C:ssa että 32 °C:ssa jotta jatkossa mittauksissa on oikea lämpötila.

Paremmaksi lämpötilaksi osoittautui 32 °C, koska taulukosta 5 on havaittavissa, että 25 °C:ssa tuloksissa on enemmän negatiivisia arvoja kuin 32 °C:ssa. Taulukossa olevista tuloksista on vähennetty näytteiden fluoresenssi tulokset ennen sisäisen standardin lisäystä. Negatiivisten arvojen määrä johtuu siitä että sisäinen standardi ei toimi halutulla tavalla 25 °C:ssa ja reaktio ei ole silloin tapahtunut oikein.

Kuviossa 14 aktiivisuuden arvot molemmilla lämpötiloilla olivat keskenään samalla tasolla, mutta taulukon 5 tulokset ratkaisivat valinnan, koska 32 °C:ssa oli vähemmän negatiivisia arvoja kuin 25 °C:ssa.



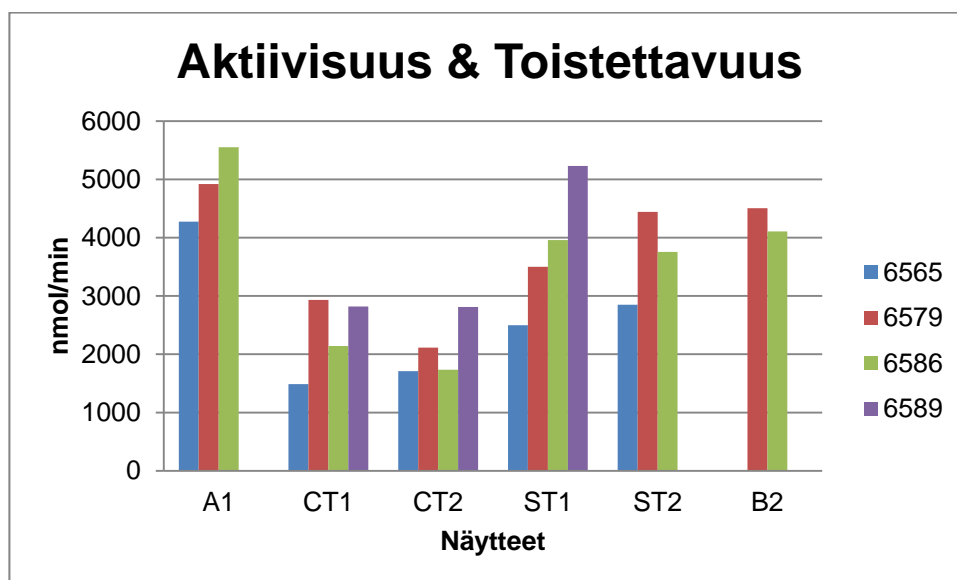
Kuvio 14. Aktiivisuuden tulokset eri lämpötiloilla.

Taulukko 5. 50 mM vetyperoksidin negatiiviset ja positiiviset tulokset joista on vähennetty fluoresenssin tulos ennen sisäisen standardin lisäystä.

Näyte	32 °C	25 °C
A1	2897	-25038
B2	-6755	-54472
CT1	1156	2045
CT2	17117	10312
ST1	8860	-8292
ST2	-8109	-28380

8.1.9 Mittauksen toistettavuus

Kuviossa 15 on esitetty eri päivinä tehtyjä mittauksia samoilla näytteillä. Määri-tyksissä 6565 ja 6586 on tehty verinäytteistä jotka on pakastettu toistamiseen, joten ne antavat automaattisesti hieman alemman tuloksen kuin vain kerran pakastetut näytteet joita ovat määri-tykset 6579 ja 6589. Menetelmä on toistetta-va, koska kuviossa 15 on havaittavissa trendi eri mittausten välillä.



Kuvio 15. Näytteiden aktiivisuus ja toistettavuus.

8.1.10 Optimoitu ROS-mittaus

Kun mittauksen kaikki kohdat saatiin optimoitua, ROS-mittauksen rakenteeksi tuli seuraavanlainen:

Verinäytteet

1. Verinäytteet laimennetaan ensin 0,9 % Natriumkloridi liuoksella (alkulaimennos 100 µl verta + 5,0 ml 0,9 % NaCl)
2. Mitataan näytteiden proteiinipitoisuus, jotta voidaan laskea miten verinäytteet tullaan laimentamaan ROS-mittausta varten
3. Tämän jälkeen verinäytteet laimennetaan 1 mg/ml:n pitoisuuteen ja jaetaan useampaan eppendorf-putkeen, jotta näytteistä saadaan varmuuden vuoksi rinnakkaisia.

DCFH-DA

1. Tehdään 1 mM DCFH-DA:n kantaliuos, joka laimennetaan metanoliin
2. Otetaan DCFH-DA:n kantaliuoksesta 0,55 µl ja laimennetaan 1,0 ml:ksi metanolilla, jotta saadaan 0,55 µM DCFH-DA -liuos jota käytetään fluoresoivana aineena ROS-mittauksessa.

Standardi: Vetyperoksidi

Standardina käytetään 50 mM vetyperoksidia.

Inkubaatiolämpötila

1. Inkubaatiolämpötila on 32 °C

Menetelmä

Verinäytteitä pipetoidaan 50 µl mustalle 384-kuoppalevyille triplikaatteina. Nollanäytettä, eli metanolia laitetaan erikseen jokaiseen näytteeseen ja jokaista näytettä pipetoidaan vielä erikseen, jotta näytteille lisätään automatisoidulla dispenserillä 0,5 µl 0,55 µM DCFH-DA:ta ja mitataan perkinelmerin envision-kuoppalevyn lukijalla fluoresenssi. Mittaus suoritetaan niin, että laite mittaa minuutin välein fluoresenssin 15 minuutin ajan. Tämän jälkeen ensimmäisen mitauskierroksen jälkeen näytteisiin lisätään automatisoidusti dispenserillä 50 mM vetyperoksidia 5 µl/kuoppa niihin verinäytteisiin, joihin lisättiin pelkkää DCFH-DA:ta ja suoritetaan sama 15 minuutin mittaus uudelleen.

9. TULOKSET/SILMÄLOISET

9.1 Silmäloisten näytteenkäsittely

Näytteet liuotetaan 40 µl puskuria (100 mM K-fosfaatti + 150 mM KCl pH 7,4), jotta näytteistä tulisi vahvoja proteiinipitoisuukseltaan. Näytteiden homogenisointi suoritetaan kuten kohdassa 7.1.

Mittausvaiheessa näytteitä pipetoidaan kolme rinnakkaista joista lasketaan keskiarvo. Jokaiselle levyille laitetaan myös lohikontrolleja, joiden tiedetään toimivan mittauksessa, - ja se varmistaa, että mittaus on onnistunut mikäli silmäloisnäytteiden tulokset eivät näytä oikeanlaisilta. Lohikontrolleilla pystytään myös tarkkailemaan eri levyjen välisiä eroja.

Menetelmistä kaikki eivät toimineet uuden näytematriisin kanssa, mutta seuraavia menetelmiä kokeilimme silmäloisnäytteillä:

- Proteiinimittaus
- GP
- GR
- GSH-GSSG
- SOD
- CAT
- GST
- G6PDH

9.1.1 Silmäloisten proteiinimääritys

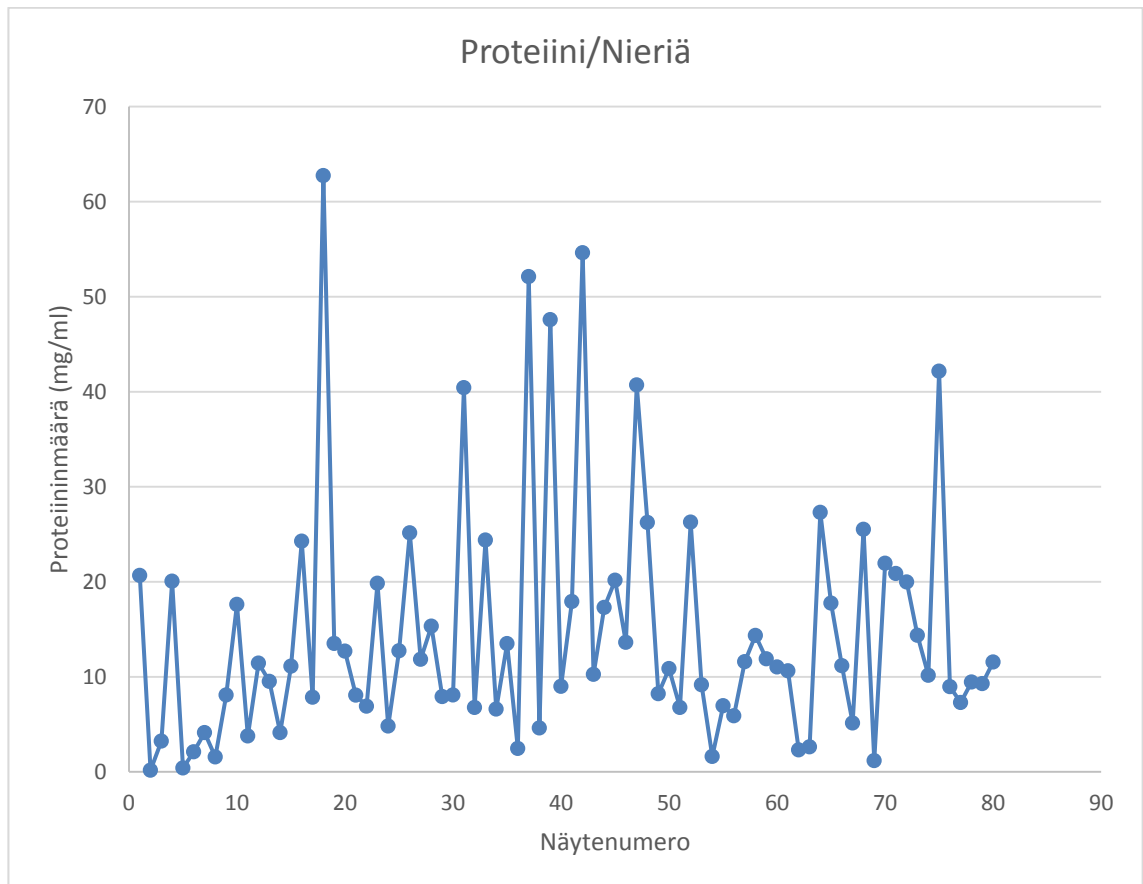
Silmäloisista mitattiin niiden proteiinipitoisuus (taulukko 6), jotta kaikki antioksidanttipuolustuksen mittaukset ja tulokset oli mahdollista suorittaa. Kaikki näytteet oli homogenisoitu samaan määrään puskuria, mutta silti niiden proteiinipitoisuuksissa oli suuria eroja. Tämän takia useimmat näytteistä jouduttiin mittaa-

maan uudestaan, jotta pitoisuus osuisi standardisuoralle. Myös triplikaattien välisen CV-% tuli olla alle 10.

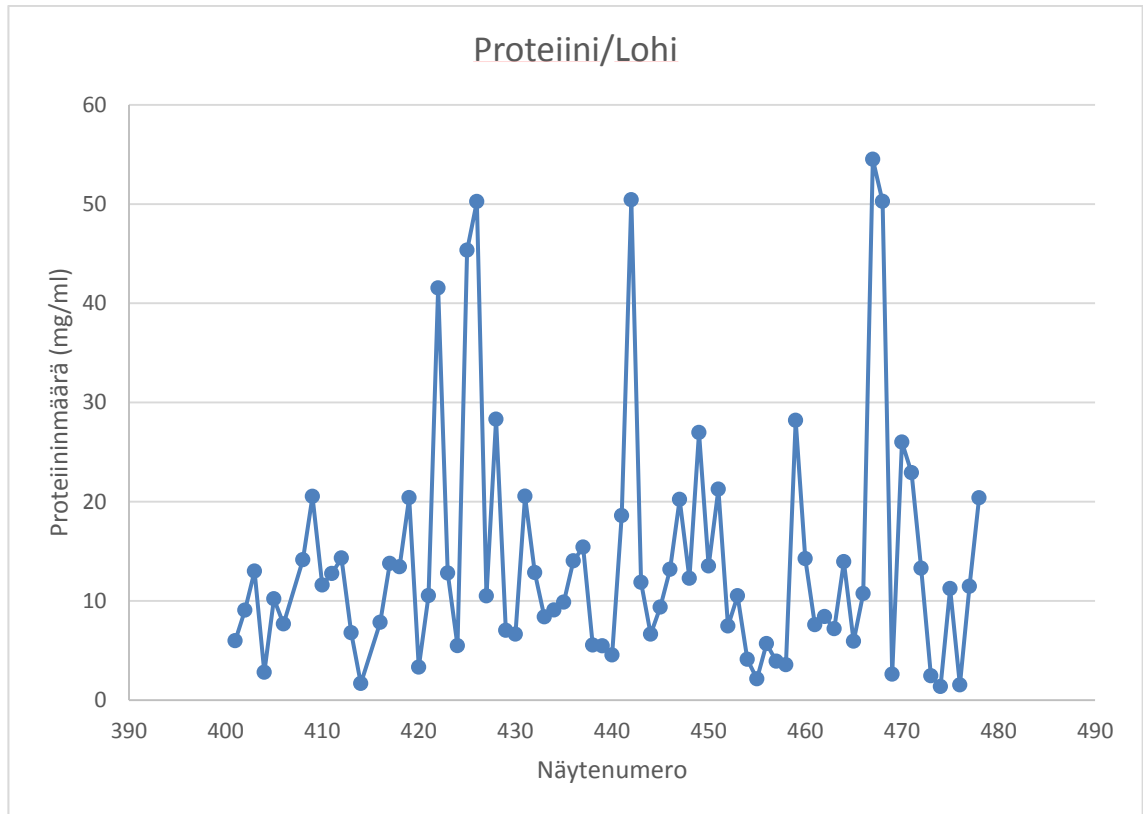
Taulukko 6. Näytteiden proteiinitulosten minimi, maksimit ja keskiarvot.

Proteiinimäärät	Kaikki (mg/ml)	Nieriä (mg/ml)	Lohi (mg/ml)
Minimi	0,16	0,16	1,37
Maksimi	62,75	62,75	54,51
Keskiarvo	14,37	14,66	14,07

Nieriästä otettujen silmäloisnäytteiden proteiinipitoisuudet erot (kuviossa 16) ja kaikki lohesta otettujen proteiinipitoisuuksien erot (kuviossa 17).



Kuvio 16. Nieriänäytteiden kaikki proteiinitulokset.



Kuvio 17. Lohinäytteiden kaikki proteiinitulokset.

9.1.2 GP

GP-mittausten tuloksissa oli negatiivisia eikä positiivisia lukuarvoja (taulukko 7), jonka takia voidaan todeta että GP-mittaus ei sovellu silmäloisten mittaamiseen. Mittauksessa käytettiin lohikontrolleja vertailuna ja niiden tulokset olivat korkeampia kuin silmäloisten, mikä vahvistaa myös sen ettei GP-mittaus toimi silmäloisilla. Taulukossa 8 on esitetty harmaalla alueella lohikontrollien tulokset ja kaikki muut tulokset ovat silmäloisnäytteiden.

Taulukko 7. GP-mittausten positiivisten ja negatiivisten lukumäärät.

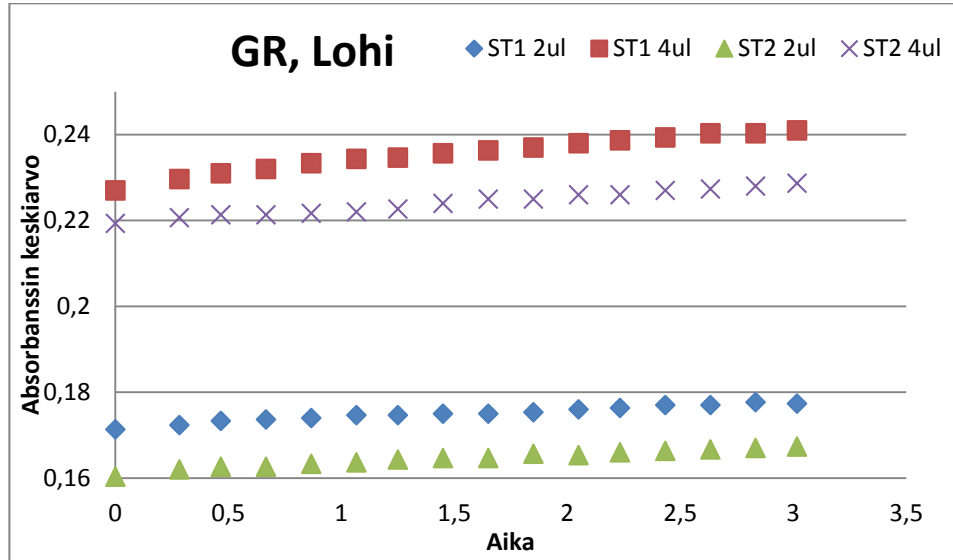
Levy	Positiiviset (lkm)	Negatiiviset (lkm)
6695	8	24
6696	7	25
6697	7	25
6698	10	22
6699	12	20
6700	20	12

Taulukko 8. GP-mittausten kaikki tulokset.

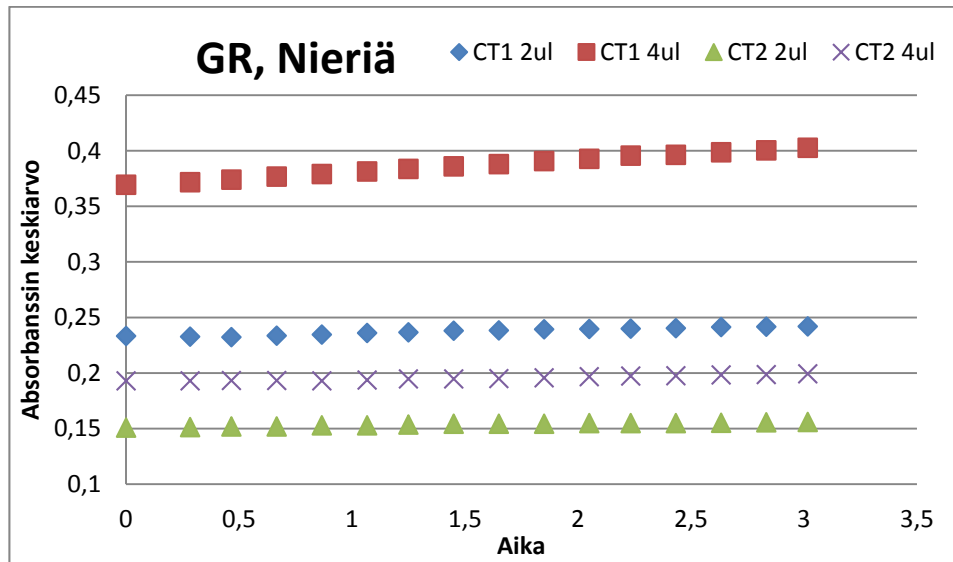
	6695	6696	6697	6698	6699	6700
Kuoppa	Aktiivisuus	Aktiivisuus	Aktiivisuus	Aktiivisuus	Aktiivisuus	Aktiivisuus
A1-3	0,132564	0,125173	0,133250	0,148961	0,167942	0,180956
A4-6	0,128338	0,130178	0,132111	0,133752	0,146693	0,120582
A7-9	0,107075	0,128979	0,114189	0,115875	0,134300	0,127100
A10-12	0,015959	-0,075625	-0,006687	-0,002753	-0,028541	-0,002804
A13-15	-0,001731	-0,012554	-0,022556	-0,016285	0,001174	-0,014740
A16-18	-0,028007	-0,004934	-0,026467	-0,000101	-0,033665	0,002186
A19-21	-0,019376	-0,034671	-0,020825	-0,004237	-0,004153	0,016144
A22-24	0,003889	-0,024579	-0,022646	-0,007699	-0,002602	-0,007007
B1-3	-0,019196	-0,020623	0,000079	-0,012419	-0,009120	-0,009390
B4-6	-0,013059	-0,017723	-0,020286	-0,012014	-0,002467	0,067550
B7-9	-0,011329	0,004754	-0,010733	0,007541	0,005985	0,061436
B10-12	-0,008676	-0,024669	0,010531	-0,011317	-0,012784	0,018549
B13-15	-0,007260	0,000978	-0,018937	-0,010553	-0,001882	0,061639
B16-18	-0,019038	-0,000596	-0,009542	-0,013812	0,056199	0,014279
B19-21	-0,031446	-0,005855	-0,042763	-0,013790	-0,009075	0,007963
B22-24	-0,020409	0,026827	-0,030940	-0,008238	0,003467	-0,006311
C1-3	-0,012722	-0,002529	-0,027344	-0,010958	-0,007187	0,004681
C4-6	-0,044438	-0,020915	-0,019162	0,009542	-0,004490	-0,002939
C7-9	-0,018094	-0,050068	-0,019791	-0,019364	-0,013144	-0,004962
C10-12	-0,009890	-0,019117	-0,019387	-0,010913	-0,011997	-0,006535
C13-15	0,002248	-0,011632	-0,040583	-0,012756	0,006434	0,042353
C16-18	0,009081	0,031030	-0,016375	-0,026310	-0,011705	0,002995
C19-21	-0,007440	-0,023455	-0,008575	0,047798	0,045028	-0,001995
C22-24	-0,022770	-0,019499	-0,048787	-0,028602	-0,008401	0,007378
D1-3	-0,023017	-0,001000	-0,005001	-0,015925	-0,004602	0,001781
D4-6	-0,012093	-0,024579	0,006777	0,040988	-0,004760	-0,008828
D7-9	-0,009261	-0,022174	-0,006080	0,036447	-0,005681	-0,004782
D10-12	-0,009463	-0,009744	0,007811	-0,001630	0,000051	-0,002894
D13-15	0,004451	-0,005473	-0,015813	0,027591	0,001354	0,007288
D16-18	-0,050192	-0,028827	-0,009721	-0,014262	-0,010064	0,000051
D19-21	-0,030682	-0,027771	-0,009924	-0,022871	-0,002647	0,010075
D22-24	-0,021691	-0,018308	-0,015183	0,004731	0,029518	0,001534

9.1.3 GR

GR-mittaus toimii silmäloisilla ja kuvioissa 18 ja 19 on esitettyä testinäytteiden eri pitoisuuksien suorat molemmilla kaloille.



Kuvio 18. Lohen testinäytteiden suorat 2 ja 4 µl pitoisuuksilla.



Kuvio 19. Nieriän testinäytteiden suorat 2 ja 4 µl pitoisuuksilla.

GR-mittauksia pipetoitiin neljä riviä kerrallaan mittaukseen, jolloin levyjä tuli yhteensä kuusi, jotta kaikki näytteet saatiin tehtyä. Levyjen välisiä eroja haluttiin vertailla laadullisista näkökulmista (taulukko 9) ja se toteutettiin vertaamalla kaikkia muita levyjä ensimmäisen levyn lohikontrollien tuloksiin (taulukko 10).

Siksi ensimmäisen mittauksen keskiarvo on 1. Kaikki levyt olivat kuitenkin hyvin läheisiä keskenään eikä mitään tarvinnut hylätä.

Taulukko 9. Levyjen väliset erot.

Mittaus	Keskiarvo
A6751	1
A6752	1,018445
A6753	0,97964
A6754	0,824084
A6755	0,930067
A6756	0,96069

Taulukko 10. Lohikontrollien tulokset.

A6751	A6752	A6753	A6754	A6755	A6756
6,870298	6,718134	6,83482	6,292027	5,629351	6,57566
6,208992	6,285622	6,118182	4,610442	5,574936	5,818201
5,706182	6,077885	5,470571	4,644134	6,122417	5,637118

9.1.4 GSH-GSSG

GSH-GSSG:n mittaus toimi silmäloisilla koska tulokset olivat positiivisia eikä negatiivisia tuloksia tullut.

9.1.5 SOD

SOD-mittaus ei soveltunut silmäloisnäytteille, koska näytteiden tulokset olivat positiivisia kontrollinäytteitä korkeampia, joka siis periaatteessa antaa maksimituloksen. Näytteiden tulosten kuuluisi olla nollanäytteen keskiarvon ja positiivisten kontrollinäytteiden keskiarvon välillä. Silmäloisnäytteiden pitoisuudella 2 mg/ml näytteiden absorbanssi tulos oli alhaisempi kuin positiivisilla kontrollinäytteillä. Mutta vaikka näytelaimennosta nostettiin 4 mg/ml, absorbanssi arvo ei noussut lineaarisesti, eikä tulos ei muuttunut aikaisemmasta merkittävästi. Ilmeisesti silmäloisnäytteessä on jotain joka häiritsee määrittystä ja nostaa näytteen absorbanssia yli positiivisen kontrollin tason (epäspesifistä sitoutumista).

9.1.6 CAT

CAT-mittaus soveltui silmälois näytteille, mutta tulokset olivat alhaisempia mitä lohien verinäytteillä on aikaisemmin mitattu. Tämä johtuu siitä että silmälois näytteiden proteiinkonsentraatio oli mittauksissa 5 mg/ml, kun taas lohilla vastaava tulos oli 0,3 mg/ml.

9.1.7 GST

Mittaus ei toiminut silmäloisnäytteillä.

9.1.8 G6PDH

Mittaus ei toiminut silmäloisnäytteillä.

LÄHTEET

Afri, M., Ehrenberg, B., Talmon, Y., Cohen, Y., Frimer, A.A., 2004. Active oxygen chemistry within the liposomal bilayer. Part III. Locating vitamin E, ubiquinone and their derivatives in the lipid bilayer. *Chemistry and physics of lipids*. 131: 107-121.

Afri, M., Frimer A.A., Cohen, Y., 2004. Active oxygen chemistry within the liposomal bilayer Part IV: Locating 2',7-dichlorofluorescein (DCF), 2',7'-dichlorodihydrofluorescein (DCFH) and 2',7'-dichlorodihydrofluorescein diacetate (DCFH-DA) in the lipid bilayer. *Science direct*. Vol. 131: 123-133.

Bayir, H., MD., 2005. Reactive oxygen species. *Crit Care Med* Vol. 33 No. 12, S498-S501

Fridovich, I. 1989. An adaptation to a paramagnetic gas. *J Biol Chem*. 264: 7761-7764

Halliwell, B. & Gutteridge J.M.C., 1989. *Free radicals in Biology and Medicine*. Oxford, UK: Clarendon Press, Second edition.

Halliwell, B. & Gutteridge J.M.C., 2007. *Free radicals in biology and medicine*. Oxford: university press, Fourth edition.

Muller FL., Lustgarten MS., Jang Y., Richardson A., Van Remmen H., August 2007. Trends in oxidative aging theories. *Free Radic Biol Med*. 43 (4): 477-503.

Rantala I. & Lountamaa K. 1998. *Biologinen valomikroskopia*. Helsinki:Yliopistopaino.

Salvemini, D. & Cuzzocrea, S., 2002. Oxidative stress in septic shock and disseminated intravascular coagulation. *Free Radic Biol Med*. **33**: 1173-1185

Zhang, Y., Marcillat, O., Giulivi, C., et al. 1990 Sweden. The oxidative inactivation of mitochondrial electron transport chain components and AT-Pase. *J Biol Chem*. **265**: 16330-16336

Työohjeet ovat Turun Yliopiston, eläinfysiologian osaston tekemät ohjeet, jotka on muokattu opinnäytetyöhön sopiviksi.

Tissue Preparation for and measurement of ROS parameters

Homogenization

1. Transfer samples from liquid N₂ to ice for a couple of minutes, add steel beads and buffer to samples.

Add about 20 times buffer (μ l) related to tissue weight (mg). If the total buffer volume is large. (> ~500 μ l) homogenize the tissue with only part of the buffer and add to total volume after)

2. Place samples in cooled sample holder, fix in tissue mill, run 2x for 30 sec at highest frequency (30.0). If the holder is completely filled with samples, turn holder around for second run so that all samples have been on the outside for at least one run.

3. Remove beads with magnet, place samples on ice

(Add buffer to total volume if homogenization was done with only part of the total volume)

4. Centrifuge samples for 15 min at 10.000 g and 4°C

5. Transfer supernatants to new (1.5 ml) vials. If samples are not used directly, freeze in liquid nitrogen and store at -80°C

Protein removal for GSH / GSSG analysis

1. Prepare 5% SSA solution (e.g. 5 mg in 100 μ l)
2. Pipette 3 μ l of homogenate supernatant (\rightarrow 11.) into new vial, add 21 μ l of 5% SSA or pipette other dilutions according to the following table:

Pipetting scheme with different final dilutions and 1% SSA in final solution

homo- genate μ l	5% SSA μ l	dilution	SSA %	mix* μ l	assay buffer μ l	dilution	total dilution	final volume** μ l	final SSA %
3	21	8x	4.375	12	48	5x	40	60	0.875
5	20	5x	4.0	12	36	4x	20	48	1.0
6	18	4x	3.75	14	38.5	3.75x	15	52.5	1.0
10	20	3x	3.33	15	35	3.33x	10	50	1.0

* the mix should be prepared directly from the fresh homogenate and can then be stored at -80°C until assay procedure

**for assay in 384-well plates 3x 12.5 μ l are needed, final volume therefore has to be larger than 37.5 μ l

3. Incubate on ice for 10 min, repeatedly vortex during incubation
4. Centrifuge for 10 min at 10.000 g and 4°C
5. Transfer 12 μ l (or other volume, see table column "mix") of supernatant to new vial, freeze in liquid N₂, store at -80°C

GST (Glutathione-S-Transferase)

1. Pipette samples in 384 well plate

use sample volume 1, 3, and 5 μl (each 3x), first 3 wells blank (left empty)

2. Prepare mix for assay

- 980 μl Dulbecco's Phosphate Buffered Saline
- 10 μl 200 mM Glutathione, reduced
- 10 μl 100 mM CDNB

(adjust volume according to number of samples, for each well use 50 μl)

3. Add 50 μl of mix to wells

4. Start measurement

GR (Glutathione Reductase)

1. Preparation of solutions

Assay buffer: 100 mM K-phosphate buffer pH 7.5 containing 1 mM EDTA

- Glutathione oxid (GSSG) MW = 656.6 g/mol => prepare solution 2 mM

store at 25°C for usage, can be stored for up to 7 days at 2-8°C

- NADPH (tetra-Na-salt) MW = 833.35 g/mol => prepare solution 2 mM

(prepare fresh each day)

- DTNB MW = 396.35 g/mol => prepare solution 3 mM

(very unstable, prepare fresh solution every 4 h, store at 4°C)

Prepare the above solutions in Assay buffer

Assay

- Equilibrate GSSG-solution and Assay buffer to 25°C (RT?) for at least 10 min before starting assay
- For 384 well plate pipette in triplicate:

	Blank	GR positive control	Samples
1 Sample	–	–	1-5 µl*
2 GR positive control	–	0.5 – 1 µl	–
3 GSSG (2 mM)	25 µl	25 µl	25 µl
4 DTNB (3 mM)	12.5 µl	12.5 µl	12.5 µl
5 Assay Buffer	10 µl	9.5 – 9 µl	9 – 5 µl*
6 NADPH (2 mM)	2.5 µl	2.5 µl	2.5 µl
7 Alternative: Mix of Assay Buffer + NADPH	12.5 µl	according to sample volume	

Sample + Assay Buffer = 10 µl

Start reaction by pipetting NADPH (or Assay buffer – NADPH mix), measure at

412 nm for 1 min

CAT (Catalase)

1. Dilute 10 x Assay Buffer to 1 x Assay Buffer and equilibrate at RT
2. Dilute tissue homogenates to 5 µg protein / µl (1 x Assay buffer)
3. Prepare 10 and 200 mM H₂O₂ and equilibrate at RT
4. Kromogen
 - 150 mM potassium phosphate buffer pH 7,0 + 0,25 mM 4-aminoantipyrine + 2 mM 3,5-dichloro-2-hydrobenzene sulphone acid
5. Peroxidase
 - 1 mg peroxidase + 1,45 ml 1 x assay buffer
 - 10 µl peroxidase / 10 µl kromogen
6. Prepare Stop Solution
 - 15 mM NaN₃ (MQ-H₂O)
7. Standards

Table 1. Standards.

Standard	10 mM H₂O₂ (µl)	1 x Assay buffer
1	0	0
2	25	0,0025
3	50	0,005
4	100	0,01
5	150	0,015

8. Pipette (in Eppendorf vials):
 - 5 µl sample (5 µg/µl protein) / Blank: no sample
 - 10 µl 1x Assay Buffer / Blank: 15 µl 1x Assay Buffer
 - Start reaction with 5 µl H₂O₂, wait for 1 – 5 min

- Stop reaction with 180 μ l Stop solution

9. within 15 min

- pipette 10 μ l of reaction mixture in wells (96 well plate)
- add 200 μ l of colour reagent

10. after 15 min: measure absorbance at 520 nm

GPx (Glutathione peroxidase)Material

- GPx Assay buffer:

50 mM TRIS, containing 0.5 mM EDTA, adjust pH to 7.0 with HCl, add

1 mM NaN₃

- NADPH – GR – GSH Assay Reagent

from Sigma Kit, reconstitute one vial in 2.5 ml H₂O (only good for 3 h, do not freeze for reuse)

- Substrate H₂O₂: use 1 mM solution

Procedure

1. Equilibrate a suitable amount of Assay Buffer to RT

Pipette into 384-well plates in triplicate*

	Blank	Sample
Sample	–	1 – 5
GPx Assay Buffer	30	25 – 29
NADPH-GR-GSH mix	10	10
Substrate H ₂ O ₂	10	10

Following addition of substrate measure change in absorbance at 384 nm

SOD (Superoxide Dismutase)

Reagents

1. Prepare working solutions from Kit stock solution
2. WST: Dilute WST 1 + 19 with Buffer solution
3. Enzyme working solution: centrifuge enzyme stock solution for 5 sec, mix by pipetting, dilute 15 µl with 2.5 ml dilution buffer
4. SOD-solutions (if necessary): dilute SOD with dilution buffer to prepare SOD standard solutions: 200, 100, 50, 20, 10, 5, 1, 0.1, 0.05, 0.01, 0.001 U/ml
5. Dilute samples to a protein content of 0.3 µg/µl

Assay

Pipette into 384-well plate in triplicate:

	Sample	Blank 1	Blank 2*	Blank 3
Sample solution	5 µl	–	5 µl	–
MQ-H ₂ O	–	5 µl		5 µl
WST working solution	50 µl	50 µl	50 µl	50 µl
----- mix, measure once at 450 nm = Blank 2 -----				
Dilution buffer	–	–	5 µl	5 µl
Enzyme working solution**	5 µl	5 µl	–	–
mix thoroughly and incubate at 37°C for 20 min				

6. Measure absorbance at 450 nm
7. calculate SOD activity (inhibition rate %) using the following equation:

$$U_{SOD} \text{ (inhibition rate \%)} = \frac{(A_{blank1} - A_{blank3}) - (A_{sample} - A_{blank2})}{(A_{blank1} - A_{blank3})} \cdot 100$$

G6PDH (Glucose-6-phosphate dehydrogenase)

Reagents

1. Reaction mix: prepare complete reaction mix from chemicals in MQ-H₂O

	MW (g/mol)	final assay conc. (mM)	weights for 10 ml reaction mix (mg)
Glycylglycine	132.12	50	66.06
D-Glucose-6-phosphate	282.12	2	5.64
NADP ⁺	743.4	0.667	4.96
MgCl ₂ · 6 H ₂ O	203.30	10	20.33

2. Equilibrate to 25°C (RT) and adjust pH of mix to 7.4 with (1 M) NaOH

Activity measurement (everything in triplicate)

- 96-wells plate
- Blank: 200 µl reaction mix
- Pipette 5 – 20 µl sample

Start of reaction:

3. Add reaction mix to total of 200 µl, start measurement

- 384-wells plate
- Blank: 50 µl reaction mix
- Pipette 1 – 5 µl sample

Start of reaction:

4. Add reaction mix to total of 50 µl, start measurement

5. measure absorbance at 340 nm for approx. 5 min, determine maximum slope for samples and blanks

6. Calculate activity according to the formula:

$$U/ml = \frac{\text{slope}_{\text{sample}} - \text{slope}_{\text{blank}}}{\epsilon_{\text{NADP}/340\text{nm}} \cdot h_{\text{solution}}} \cdot \frac{\text{Vol}_{\text{total}}}{\text{Vol}_{\text{sample}}} \cdot df$$

with $\epsilon_{\text{NADP}/340} = 6.22 \text{ mol}^{-1} \text{ cm}^{-1}$ the millimolar extinction coefficient for NAD(P)+ at 340 nm, h_{solution} the height of the solution in the well in cm, $\text{Vol}_{\text{total}}$ the total volume per well, $\text{Vol}_{\text{sample}}$ the sample volume per well, and df a possible additional dilution factor for the sample.

GSH – GSSG (Glutathione reduced - oxidized)

1. Allow all solutions to come to RT for 30 min
2. Prepare ThioStarR Detection Reagent from kit vial (add DMSO)
3. Prepare Reaction Mix with NADPH and GR (Glutathione Reductase) in assay buffer
 - NADPH 4 mM
 - GR 8 U/ml
4. Prepare fresh dilutions of homogenate + 5% SSA, or take stored samples
5. Add assay buffer according to table next table:

Pipetting scheme with different final dilutions and 1% SSA in final solution

homo- genate	5% SSA	dilution	SSA	mix*	assay buffer	dilution	total dilution	final volume**	final SSA
µl	µl		%	µl	µl			µl	%
3	21	8x	4.375	12	48	5x	40	60	0.875
5	20	5x	4.0	12	36	4x	20	48	1.0
6	18	4x	3.75	14	38.5	3.75x	15	52.5	1.0
10	20	3x	3.33	15	35	3.33x	10	50	1.0

* the mix should be prepared directly from the fresh homogenate and can then be stored at -80°C until assay procedure

**for assay in 384-well plates 3x 12.5 µl are needed, final volume therefore has to be larger than 37.5 µl

6. Prepare standard diluent by diluting 5% SSA 1+4 with assay buffer
7. Prepare standards (at RT)
 - Prepare 1 mM GSH solution (in MQ-H₂O)
 - Use the following pipetting scheme for standard preparation

	1	2	3	4	5	6	7	8
Standard Diluent (µl)	975*	250	250	250	250	250	250	250
GSH 1 mM (µl)	25*							
from previous vial (µl)		250	250	250	250	250	250	250
GSH-concentration (µM)	25	12.5	6.25	3.125	1.56	0.781	0.391	0.195

Perform assay

8. Pipette in triplicate in black 384-well plate (per well)

- 15,0 µl standard or sample

- 6.5 µl ThioStarR reagent

9. incubate for 15 min at RT

10. measure fluorescent emission at 510 nm, with excitation 370-410 nm

=> free GSH

11. add 6.5 µl reaction mix

12. incubate for 15 min at RT

13. measure fluorescent emission at 510 nm, with excitation 370-410 nm

=> total GSH (= free GSH + 2x GSH from GSSG)

=> GSSG = (total GSH – free GSH) / 2