

# EXPERIMENT 10 GLUCOSE 1- DEHYDROGENASE ACTIVITY ASSAY

ولن نتوب عن أحلامنا مهما تكرر  
انكسارها ♥.

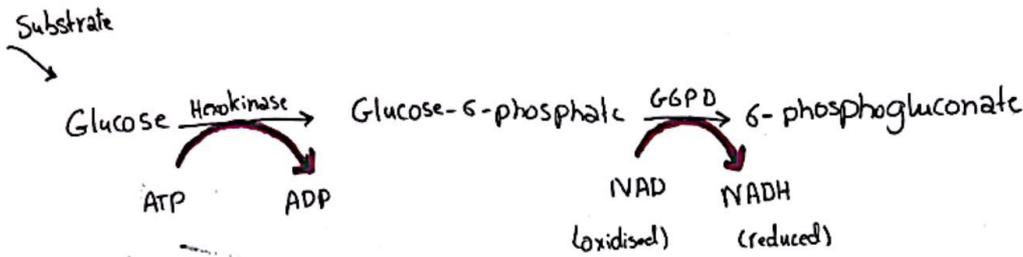


- Experiment 10 -

{ يرفع الله الذين آمنوا منكم والذين أوتوا العلم درجات }  
المجاهدين - الآية ١١

\* بقي التجربة نقيس (( Glucose 1-dehydrogenase ))

\* (( G6P )) dehydrogenase ... damage Red Blood Cell من الإبريق



\* Hexokinase: an enzyme that phosphorylates.  
\* ATP      \* NAD<sup>+</sup>

\* NADH الذي ينتج  
↓  
مع تفاعل مع developer  
وتحول لونية بلون بقدر أقيما  
ع 450 نانومتر.

حتى لو كانت (( Activity )) القليلة فستكون ممكنة أقيما  
\* مثلاً: 10.01  
\* عالي بقدر أقيما.. ✓ G6PD enzyme

\* GDH assay buffer  $\rightarrow$  pH Constant  $\rightarrow$  7.9  $\rightarrow$  ~~Solution~~ Solution  
\* Glucose (2M)  $\rightarrow$  Substrate.  $\rightarrow$  Solution  $\rightarrow$  NAD<sup>+</sup> موجودة معها.

\* Developer  $\rightarrow$  when i finished, give me NADH.  $\rightarrow$  i will put developer.  $\rightarrow$  lyophilized.  
\* من أقيما الأساسية عناية التفاعل يمشي

1 vial  
\* GDH positive control (lyophilized)  
\* NADH standard  $\rightarrow$  (lyophilized)

\* لازم أكل (Centrifugation) كذا (powder) مخصص يكون منظر على ال vial قبل.

\* Store the kit at  $\rightarrow$  -20°C, protected from light  
\* لما نأكله، الشتر فيه لازم أبلع ال Buffer قبل بوقت ويصير درية مارة = room temp.

\* Reconstitute :

مبدأ قنطرة \* Centrifugation

\* ① Developer  $\xrightarrow{\text{بضيق}}$  0.9 mL of ddH<sub>2</sub>O

distillation بضيق \*  
مربى

\* ② pipetted up & down Several time.  $\rightarrow$  \* حتى powder يذوب \*  
.. Mixing & Shaking \*  
مربى

\* Reconstitute:

\* ① GDH positive Control  $\xrightarrow{\text{بضيق}}$  220  $\mu$ l assay buffer

\* خلال عملية التحضير لازم أخليه بال ice \*  
\* بظلمة : Aluminium foil حتى أخليه من 11 light \*

\* ② Aliquot & Store at -20°C.

شريعني ؟

\* the GDH positive Control  $\rightarrow$  less stability  $\rightarrow$  2 months at -20°C after reconstitution ..

Lyophilized  $\rightarrow$  1-2 year

\* freeze - thaw Cycles  $\leftarrow$  Stimes

\* إذا الضمن كمالاً بسخنمه وبيع ادفعه الغرور  
ويعمكن اربع اسخنمه مرة ثابتة من مش  
أكثر من 5 مرات :

\* NADH  $\rightarrow$  50 mL dd H<sub>2</sub>O  $\rightarrow$  generate 10 mM NADH stock Solution.

Reconstituted  $\rightarrow$  NADH (10 mM)  
 $\rightarrow$  Supplied Glucose (2M)  $\rightarrow$  Stable for up 6 months at -20°C.

\* total kit  $\leftarrow$  من 11 هو أكثر من 2 months لأن 11 Enzyme و 11 Developer و 11 Stability الم من شهرين !!

# NADH Standard Curve:

\* أول خطوة في اختبار الـ NADH Standard Curve

1 mM dilution ← dilution to generate 10 mM NADH stock \*

+ 90 µL of assay Buffer \*  
\* بكمية 90 ميكرو لتر

0	- 2	- 4	- 6	- 8	- 10
↓	↓	↓	↓	↓	↓
50	48	46	44	42	40

\* لكل 50 µL من الـ assay buffer  
\* حتى أول 50 ..

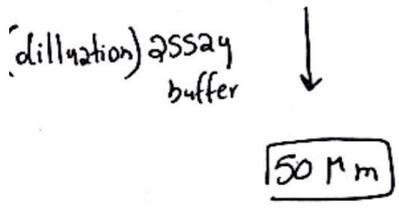
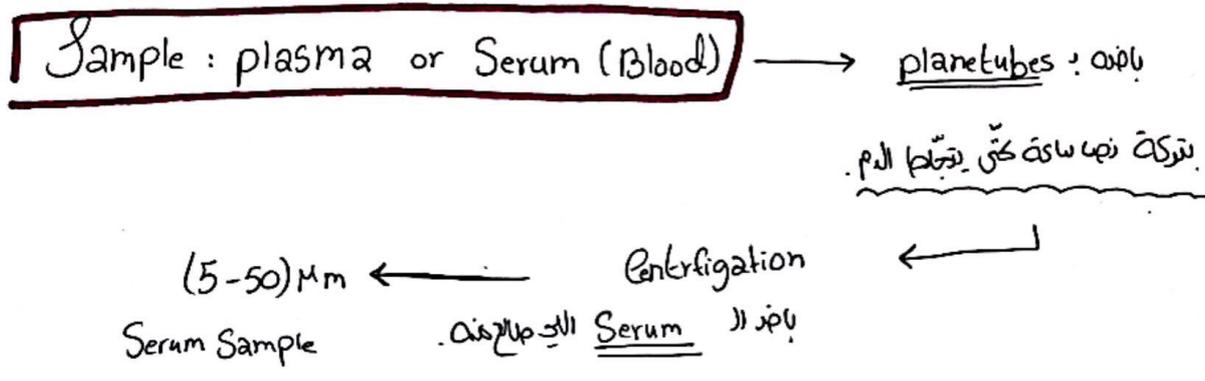
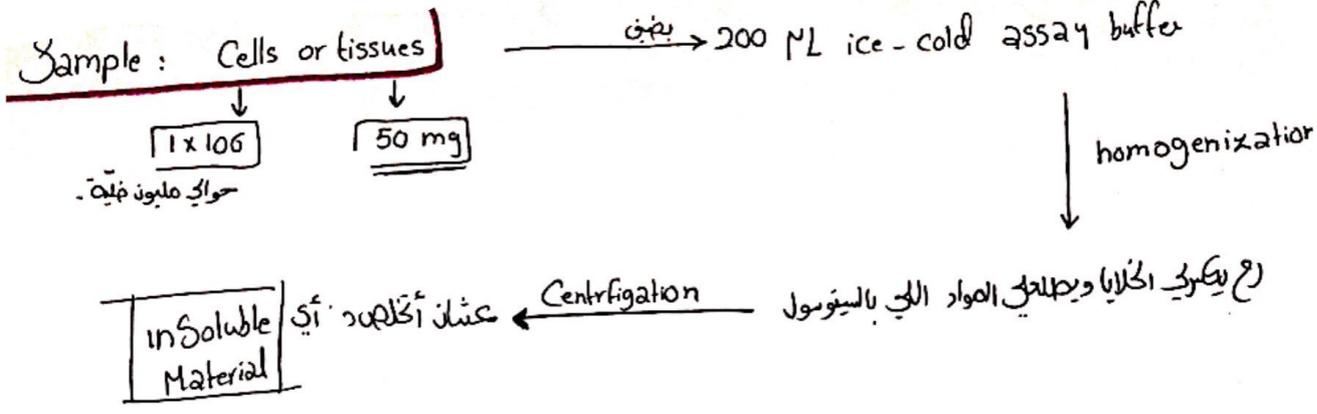
Curve

Absorbance 450 nm → Y  
NADH (nmol) → X

→ حساب الـ Conc. و الـ G6PD بالعينات ..

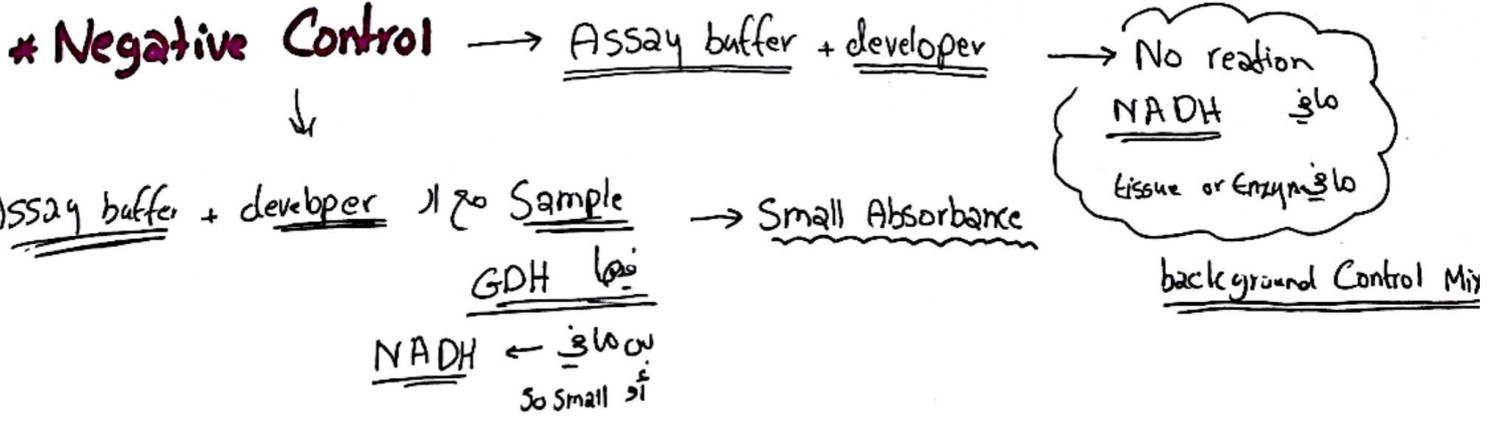
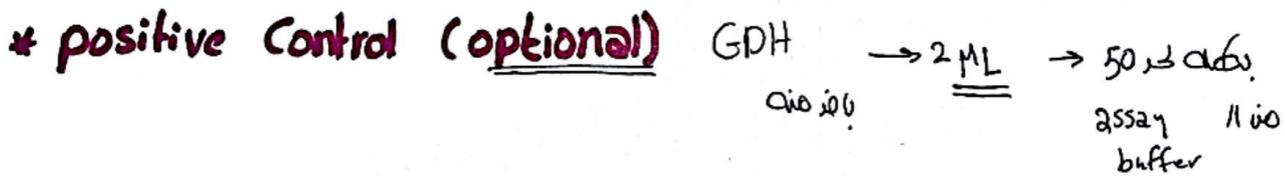
\* ما بين الـ NADH والنتيجة

\* أن عني الـ NAD<sup>+</sup> ← الـ NADH هو الذي يتفاعل مع الـ developer ويعطي  
مع Buffer



\* ممكن بعني المرتبة آخذ أكثر من Conc. عن ما يعرف  
 \* Enzyme Activity لا يكتسب  
 \* ممكن سالية ممكن فلية

\* well 50 Mm Buffer 11 Volume بكل 11



# next Step → add reaction Mix

GDH Sample + assay buffer + GDH developer + 2M Glucose  
 فيقياا (82) mL (8M) (10 mL)  $82 + 8 + 10 = 100$

\* حتى ما يكون عندي كمية نبات خاصة ما بضيف كل مرة .. عشان أقل النبات بضيفهم كل مرة مرة واحدة .  
 بظلمهم مع بعض .

\* مثلاً عندي 20 عينة ..

\* بضرِب الكيمياء الي لازم اضيفهم ب (20) + 10% من الكيمياء الي عندي عشان اتقار ال Error

$20 \times 0.1 = 2$        $20 + 2 = 22\%$       ~~20~~

\* هيك بظلمهم مع بعض + بضيف 100 mM بكل well

\* بعد ما حضرت النبات ووضعت ال Reaction Mix ← بجل Mix لثانية 3 دقائق على 37°C وال 450 nm

\* كل 5 دقائق نقيس ال Absorbance ← Curve ← Linear part ← يجب ال GDH Activity

\* بالنسبة لـ NADH Standard ← ما في reaction ما سكتة احنا ← End point

## \* Calculation :

\* كل القراءات بطلع منها ال Negative Control

\* بوس ال Curve لـ NADH ← يجب ال GDH activity

\* فرق ال absorbance كم بتعال GDH ؟  
 \* فرق ال time

$$GDH \text{ activity} = \frac{B}{\Delta T \times V} \times \text{dilution factor}$$

\*  $V: mL$

... Saia dwaitkat

# GENERAL TROUBLESHOOTING GUIDE:

Problems	Cause	Solution
Assay not working	<ul style="list-style-type: none"> <li>• Use of ice cold assay buffer</li> <li>• Omission of a step in the protocol</li> <li>• Plate read at incorrect wavelength</li> <li>• Use of a different 96-well plate</li> </ul>	<ul style="list-style-type: none"> <li>• Assay buffer must be at room temperature</li> <li>• Refer and follow the data sheet precisely</li> <li>• Check the wavelength in the data sheet and the filter settings of the instrument</li> <li>• Fluorescence: Black plates (clear bottom), Luminescence: White plates, colorimetric: clear plates</li> </ul>
Samples with erratic readings	<ul style="list-style-type: none"> <li>• Use of incompatible sample type</li> <li>• Samples prepared in different buffer</li> <li>• Samples were not deproteinized (if indicated in data sheet)</li> <li>• Cell/tissue sample were not completely homogenized</li> <li>• Samples used after multiple freeze-thaw cycles</li> <li>• Presence of interfering substance in the sample</li> <li>• Use of old of inappropriately stored samples</li> </ul>	<ul style="list-style-type: none"> <li>• Refer data sheet for details about incompatible samples</li> <li>• Use the assay buffer provided in the kit or refer data sheet for instruction</li> <li>• Use the 10-kDa spin cut-off filter or PCA precipitation as indicated</li> <li>• Use the Dounce homogenizer (increase the number of strokes), observe for lysis under microscope</li> <li>• Aliquot and freeze samples if needed to use multiple times</li> <li>• Troubleshoot if needed</li> <li>• Use fresh samples or store at correct temperatures until use</li> </ul>

# GENERAL TROUBLESHOOTING

Lower/higher readings in samples and standards	<ul style="list-style-type: none"><li>• Improperly thawed components</li><li>• Use of expired kit or improperly stored reagents</li><li>• Allowing the reagent to sit for extended times on ice</li><li>• Incorrect incubation times or temperature</li><li>• Incorrect volumes used</li></ul>	<ul style="list-style-type: none"><li>• Thaw all components completely and mix gently before use</li><li>• Always check the expiry date and store the component appropriately</li><li>• Always thaw and prepare fresh reaction mix before use</li><li>• Refer data sheet and verify correct incubation times and temperature</li><li>• Use calibrated pipettes and aliquot correctly</li></ul>
--	--	--



# GENERAL TROUBLESHOOTING GUIDE:

<p>Readings do not follow a linear pattern for standard curve</p>	<ul style="list-style-type: none"> <li>• Use of partially thawed components</li> <li>• Pipetting error in the standard</li> <li>• Pipetting error in the reaction mix</li> <li>• Standard stock is at an incorrect concentration</li> <li>• Calculation error</li> <li>• Substitution reagents from older kits/lots</li> </ul>	<ul style="list-style-type: none"> <li>• Thaw and resuspend all components before preparing the reaction mix</li> <li>• Avoid pipetting small volumes</li> <li>• Prepare a master reaction mix whenever possible</li> <li>• Pipette gently against the wall of the tubes</li> <li>• Always refer the dilutions in the data sheet</li> <li>• Recheck calculations after referring data sheet</li> <li>• Use fresh components from the same kit</li> </ul>
<p>Unanticipated results</p>	<ul style="list-style-type: none"> <li>• Measured at incorrect wavelength</li> <li>• Samples contain interfering substances</li> <li>• Use of incompatible sample type</li> <li>• Sample readings above/below the linear range</li> </ul>	<ul style="list-style-type: none"> <li>• Check the equipment and filter setting</li> <li>• Troubleshoot if it interferes with the kit</li> <li>• Refer data sheet to check if the sample is compatible with the kit or optimization is needed</li> <li>• Concentrate/dilute sample so as to be in the linear range</li> </ul>