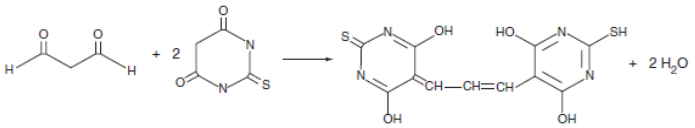
کیت سنجش پراکسیداسیون لیپید (مالون‌دی‌آلدهید)

Nalondi™ Lipid Peroxidation (MDA) Assay Kit

مقدمه:

مالون‌دی‌آلدهید همان‌گونه که از نامش پیداست ترکیبی آلدهیدی، فعال و بسیار واکنش‌پذیر است و طی واکنش پراکسیداسیون اسیدهای چرب غیراشباع تولید می‌شود. بنابراین با اندازه‌گیری میزان مالون‌دی‌آلدهید در نمونه‌های بیولوژیک مختلف می‌توان به میزان پراکسیداسیون چربی‌ها پی‌برد. پراکسیداسیون لیپید در اثر آسیب سلولی در گیاهان و جانوران رخ داده و به عنوان نشانگر برای اندازه‌گیری سطح استرس اکسیداتیو در سلول‌ها و بافت‌ها کاربرد دارد. سنجش مالون‌دی آلدهید به روش Thiobarbituric Acid Reactive Substances (TBARS) روشی مناسب جهت اندازه‌گیری میزان پراکسیداسیون لیپید است که در نمونه‌های انسانی، حیوانی و گیاهی کاربرد دارد. در صورتیکه پروتئین‌ها در ابتدا توسط رسوب‌دهنده اسیدی رسوب داده شوند، کمتر با محلول TBARS واکنش داده و نتایج اختصاصی‌تری از میزان پراکسیداسیون لیپید به‌دست خواهد آمد.

کیت سنجش پراکسیداسیون لیپید **Nalondi™** روشی ساده، تکرارپذیر و استاندارد برای اندازه‌گیری میزان مالون‌دی‌آلدهید و آگاهی از پراکسیداسیون لیپیدی در نمونه‌های بیولوژیکی مانند سرم، پلاسما، ادرار، بافت هموژنه، لیزات سلولی و مایع محیط کشت را فراهم می‌کند. بطور خلاصه مالون‌دی‌آلدهید با تیوباربیتیوریک اسید (TBA) در دمای بالا، واکنش داده و محصول صورتی رنگی تولید می‌کند که با روش رنگ‌سنجی اندازه‌گیری می‌شود.



محتوای کیت:

ردیف	دمای نگهداری	نام ماده	۴۸ تست	۹۶ تست
۱	2-8 °C	**Reagent 1_{2x}**	۱۰ میلی‌لیتر	۲۰ میلی‌لیتر
۲	2-8 °C	**Reagent 2**	۱۰ میلی‌لیتر	۲۰ میلی‌لیتر
۳	2-8 °C	**Reagent 3**	۱۰ میلی‌لیتر	۲۰ میلی‌لیتر
۴	2-8 °C	**Standard solution**	۱ میلی‌لیتر	۱ میلی‌لیتر
۵	2-8 °C	**BHT_{100x}**	۱۰۰ میکرولیتر	۲۰۰ میکرولیتر
۶	2-8 °C	**Precipitation Reagent**	۶/۲۵ میلی‌لیتر	۱۲/۵ میلی‌لیتر
۷	2-8 °C	**Acid Reagent**	۲۵ میلی‌لیتر	۵۰ میلی‌لیتر
۸	2-8 °C	**Lysing Buffer**	۱۵ میلی‌لیتر	۳۰ میلی‌لیتر
۹	-	**96-Well plate**	۱ عدد	۱ عدد

موارد مورد نیاز که در داخل کیت موجود نیست:

- میکروپلیت‌ریدر با قابلیت اندازه‌گیری جذب (OD) ۵۵۰ نانومتر
- پلیت تیره ته‌صاف (درصورت سنجش به روش فلوریمتریک)
- هموژنایزر (در صورت استفاده از بافت به عنوان نمونه)
- فسفات بافر (در صورت استفاده از سلول به عنوان نمونه)
- آب دیونیزه استریل
- تیوب/ لوله جهت تهیه سری استاندارد
- سانتریفوژ
- بن‌ماری ۹۵ درجه

Copyright © 2020 Navand Salamat. All rights reserved

مراحل انجام آزمایش:

۱) آماده‌سازی نمونه‌ها:

نمونه‌های بافتی یا سلولی: به ۱۰ میلی‌گرم از بافت مورد نظر و یا $۱۰^{۷}$ سلول، ۳۰۰ میکرولیتر Lysis Buffer و ۳ میکرولیتر BHT_{100x} اضافه و سپس هموژن کنید. برای حذف مواد نامحلول، به مدت ۳ دقیقه در ۱۳۰۰۰ دور سانتریفیوژ کنید. از مایع رویی به عنوان نمونه استفاده کنید.
توجه: به دلیل دخالت هموگلوبین در اندازه‌گیری، نمونه‌های بافتی در هنگام نمونه‌برداری باید با PBS خنک کاملا شستشو داده شوند.

نمونه‌های سرم/ پلاسما: برای اندازه‌گیری MDA در نمونه سرم یا پلاسما، ابتدا ۲۰ میکرولیتر از نمونه را داخل لوله آزمایش بریزید. سپس مقدار ۵۰۰ میکرولیتر Acid Reagent را لوله حاوی نمونه اضافه کنید. در مرحله بعد با اضافه کردن ۱۲۵ میکرولیتر Precipitation Reagent به لوله، پس از ۵ دقیقه انکوباسیون در دمای اتاق، به مدت ۳ دقیقه در ۱۳۰۰۰ دور سانتریفیوژ کنید. مایع رویی را دور ریخته و به مواد ته‌نشین شده روی یخ، ۱۰۰ میکرولیتر آب مقطر دیونیزه و ۲ میکرولیتر BHT_{100x} اضافه کنید. مخلوط حاصل را ورتکس کنید و در نهایت حجم نهایی را با استفاده از آب مقطر دیونیزه، به ۲۰۰ میکرولیتر برسانید.
نمونه‌های ادرار: تا زمان انجام آزمون، نمونه‌های ادرار باید در دمای منفی ۸۰ درجه سانتیگراد نگهداری شود. برای از بین بردن مواد نامحلول، نمونه قبل از آزمایش باید سانتریفیوژ شود. غلظت MDA در ادرار، می‌تواند با غلظت کراتینین و یا سایر نشانگرهای مناسب نرمالیزه شود.

۲) آماده سازی محلول کار:

نیم ساعت قبل از شروع آزمایش معرف‌ها را به دمای اتاق رسانده و در صورت مشاهده کریستال، معرف‌ها را تا دمای ۵۰ درجه (توسط بن‌ماری) گرم کنید و پس از ورتکس استفاده نمایید. معرف $R1_{2x}$ را با آب مقطر دیونیزه به حجم دو برابر برسانید؛ بدین‌صورت که یک میلی‌لیتر از $R1_{2x}$ را با یک میلی‌لیتر آب دیونیزه مخلوط و سپس استفاده نمایید. برای تهیه محلول کار، معرف‌های R1 (آماده شده)، R2 و R3 را به نسبت‌های **۱:۱:۲** با هم مخلوط کنید (مثال: دو میلی‌لیتر از معرف R1 با یک میلی‌لیتر از معرف R2 و یک میلی‌لیتر معرف R3 مخلوط و ورتکس نمایید).

توجه: دقت داشته باشید که محلول کار باید به صورت تازه (کمتر از ۶ ساعت تا مصرف) تهیه شود.

۳) آماده سازی محلول استاندارد:

- ✓ **روش کالریمتریک:** غلظت استاندارد موجود در کیت ۰/۱ مول می‌باشد که از آن ۲۰ میکرولیتر برداشته و در ۹۸۰ میکرولیتر آب مقطر دیونیزه رقیق نمائید. غلظت محلول حاصل ۲ میلی‌مولار بوده و برای رسم منحنی استاندارد طبق جدول روبرو غلظت‌های مختلف را تهیه نمائید.

لوله	استاندارد ۲ میلی‌مولار (میکرولیتر)	آب مقطر دیونیزه (میکرولیتر)	غلظت نهایی استاندارد (نانومول)
A	۰	۲۰۰	۰
B	۲	۱۹۸	۲۰
C	۴	۱۹۶	۴۰
D	۶	۱۹۴	۶۰
E	۸	۱۹۲	۸۰
F	۱۰	۱۹۰	۱۰۰

- ✓ **روش فلوریمتریک:** غلظت استاندارد موجود در کیت ۰/۱ مول است. ۲۰ میکرولیتر از آن را برداشته و در ۹۸۰ میکرولیتر آب مقطر دیونیزه رقیق کنید. غلظت محلول حاصل ۲ میلی‌مولار است که از آن ۲۰ میکرولیتر برداشته و در ۱۸۰ میکرولیتر آب مقطر رقیق نمائید. غلظت محلول حاصل ۰/۲ میلی‌مولار و برای تهیه غلظت نهایی استاندارد در سنجش فلورومتریک اعداد مربوط به جدول بالا تقسیم بر ۱۰ خواهد شد تا غلظت‌های ۰، ۰/۲، ۰/۴، ۰/۶، ۰/۸ و ۱ نانومول بدست آید.

Copyright © 2020 Navand Salamat. All rights reserved

۴) روش کار:

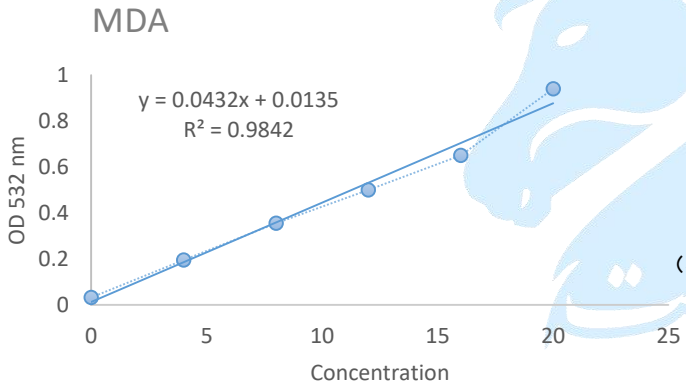
- ✓ ۲۰۰ میکرولیتر از نمونه آماده شده را (نمونه‌های بیولوژیکی که شامل سرم، پلاسما، لیز سلول، ادرار، بافت هموژن شده می‌باشد) و یا استاندارد را با ۸۰۰ میکرولیتر از محلول کار مخلوط کنید. سپس درب لوله‌های حاوی محلول را کامل ببندید (احتمال باز شدن به دلیل بخار آب و فشار آن وجود دارد) و درون بن ماری با دمای ۹۵ درجه سانتی‌گراد به مدت ۴۵ دقیقه قرار دهید. در مرحله بعد، نمونه‌ها را به مدت ۱۰ دقیقه درون ظرف حاوی آب یخ قرار دهید تا سریع سرد شوند.
- ✓ نمونه‌ها را در ۳۰۰۰ دور به مدت ۱۵ دقیقه سانتریفیوژ نموده و ۲۵۰ میکرولیتر از مایع رویی را به چاهک های پلیت ۹۶ خانه انتقال دهید و جذب مایع رویی را را در طول موج ۵۵۰ نانومتر قرائت نمائید.

* در سنجش **فلوریمتریک** جذب نمونه‌ها و استاندارد در طول موج Ex/Em 532/553 nm قرائت می‌شود.

نکته: در نمونه‌های سرم یا پلاسما در صورتی که جذب نوری نمونه‌ها (OD) بیش از ۲ باشد، توصیه می‌شود نمونه‌ها را با آب مقطر دیونیزه رقیق نموده و میزان رقت را در فرمول به جای ضریب K قرار دهید. به‌عنوان مثال، اگر نمونه خود را به‌نسبت ۱ به ۹ رقیق کرده‌اید (۱۰۰ میکرولیتر نمونه + ۹۰۰ میکرولیتر آب مقطر)، ضریب K برابر با ۱۰ خواهد بود.

۵) محاسبات:

با استفاده از نرم‌افزارهای آماری مثل اکسل، نمودار استاندارد را با توجه به اعداد به دست آمده از جدول استانداردها رسم نمائید.



فرمول خط حاصل از نمودار مقابل به شکل زیر می‌باشد:

$$y=Ax+B$$

y: جذب نوری استاندارد
A: شیب خط (مثال در فرمول نمودار مقابل این عدد برابر با ۰/۰۴۳۲ می‌باشد)
x: غلظت MDA
B: عرض از مبدا (مثال در فرمول نمودار مقابل این عدد برابر با ۰/۰۱۳۵ می‌باشد)

با توجه به فاکتور بالا میزان MDA با فرمول زیر محاسبه می‌گردد:

$$MDA = \left[\frac{(OD\ Sample - B)}{\left(\frac{A}{mg\ or\ ml}\right)}\right] \times 4 \times K$$

mg or ml: مقدار بافت یا سرم اولیه که برداشته شده است (مثال ۱۰ میلی‌گرم و یا ۰/۰۱۰ میلی‌لیتر)
4: نسبت حجم نمونه (۲۰۰ میکرولیتر) به حجم محلول کار (۸۰۰ میکرولیتر)
K: ضریب رقت برای نمونه‌ها می‌باشد (میزان رقت برای نمونه‌های رقیق نشده عدد ۱ است)

واحد پراکسیداسیون لیپید (MDA) عبارت است از: **nmol/ ml (or nmol/mg pro)**

۶) توصیه‌ها:

- محتویات کیت در یخچال (دمای ۲-۸ درجه سانتی‌گراد) نگهداری شود و نیم ساعت قبل از شروع آزمایش معرف‌ها را به دمای محیط (ترجیحاً دمای ۲۵ درجه سانتی‌گراد) برسانید.
- تمامی مواد را قبل از استفاده ورتکس نمایید به گونه‌ایی که هیچ کریستالی در معرف‌ها دیده نشود.
- ممکن است یک پژوهشگر نتایج متفاوت از آزمایش مشابه به دست بیاورد. به منظور بهتر شدن نتایج، توصیه می‌شود از هر نمونه و یا استاندارد دوبار تکرار انجام گرفته و میانگین آن‌ها را به عنوان نتیجه نهایی گزارش کنید.
- در نمونه‌های بافتی و لیزات سلولی اندازه‌گیری پروتئین نیز توصیه می‌شود که می‌توانید بدین منظور از کیت **Nadfrod™** نوند سلامت استفاده نمائید.

Copyright © 2020 Navand Salamat. All rights reserved

- هرگونه تغییر در مخلوط کردن، زمان یا دمای انکوبه و زمان مصرف کیت نتایج مختلفی را ارائه خواهد داد لذا توصیه می‌شود در تغیر هر یک از پارامترها، منحنی استاندارد جدیدی رسم شود.
- در صورتی‌که مقدار جذب نمونه OD بیشتر از بالاترین مقدار استاندارد باشد، نمونه‌ها رقیق شده و مجددا سنجش انجام گیرد.
- در صورتی که اطلاعی از وجود MDA در نمونه بیولوژیکی خود ندارید می توانید از طول موج ۴۵۰ نانومتر به جای ۵۵۰ نانومتر استفاده نمائید چرا که آلدهیدها با TBA رنگ زرد را ایجاد می‌کنند که با طول موج ۴۵۰ نانومتر قابلیت خوانش را دارد.
- قبل از شروع آزمایش، از کافی بودن مقدار نمونه‌ها اطمینان حاصل کنید.
- کیت‌های مختلف ممکن است حساسیت، محدوده تشخیص و روش کار متفاوتی داشته باشند، لذا آزمایش را دقیقا طبق روش کار مندرج در این پروتکل انجام دهید.
- محلول و مواد دیگر را جایگزین محلول و مواد و داخل کیت نکرده و تنها از مواد موجود در کیت استفاده کنید.
- پس از شروع آزمایش، تمام مراحل باید بدون وقفه کامل شود. اطمینان حاصل کنید که همه معرف‌ها، مواد و دستگاه‌ها در زمان مناسب آماده می‌شوند.
- زمان انکوباسیون نتایج را تحت تأثیر قرار خواهد داد لذا همه چاهک‌ها باید در همان ترتیب و زمان، مورد استفاده قرار گیرند.
- در زمان کار با کیت رعایت اصول ایمنی آزمایشگاهی الزامی می‌باشد.

۷) عیب‌یابی:

مشکل	احتمالات موجود	راه حل‌های پیشنهادی
عدم کارکرد سنجش یا آزمایش	سرد بودن بافر آزمایش	دمای بافر باید به دمای اتاق رسیده باشد
	از قلم افتادن یک مرحله در روند آزمایش	به پروتکل موجود مراجعه کرده و دقیقا پیروی نمایید
	پلیت ریدر در طول موج نادرست	تنظیمات فیلتر دستگاه را چک نمایید
نمونه‌ها با قرائت (خوانش) نامنظم یا نامعقول	آماده‌سازی نمونه‌ها با بافر نادرست	از بافر موجود در کیت استفاده نموده و یا به دستورالعمل موجود در پروتکل مراجعه نمایید
	نمونه‌های کشت بافت/سلول به صورت کامل هموژن نشده	هموژن کردن نمونه را تکرار نموده و مدت زمان مرحله‌ی همگن‌سازی را افزایش دهید
	استفاده از نمونه‌های چند بار دفریز شده	اگر نمونه ها چندین بار مورد استفاده قرار خواهند گرفت نمونه‌ها را در هنگام نمونه‌برداری به دو یا سه قسمت تقسیم نموده و فریز نمایید
	وجود ماده‌ی مداخله‌گر در نمونه	در صورت امکان نمونه را بیشتر رقیق نمایید
	استفاده از نمونه‌های قدیمی یا نامناسب	ترجیحا از نمونه‌های تازه استفاده کنید
خوانش بالا و یا پایین در نمونه‌ها و استانداردها	دمای نامناسب ترکیبات	اجازه دهید تمام ترکیبات به دمای اتاق رسید، سپس به آرامی ترکیب نمایید
	استفاده از کیت منقضی شده و یا نگهداری نامناسب معرف‌ها	تاریخ انقضای کیت را چک نموده و معرف‌ها را در شرایط مناسب نگهداری نمایید
	قرار گرفتن طولانی مدت معرف‌ها در معرض یخ	محلول کار را قبل از استفاده آماده کنید
	زمان و درجه حرارت نامناسب انکوباسیون	به پروتکل مراجعه کرده و زمان و دمای مناسب انکوباسیون را بررسی نمایید
	استفاده از حجم‌های نامناسب	از سمپلر کالیبره شده استفاده نمایید
منحنی استاندارد غیر خطی (با ضریب رگرسیون زیر ۰/۸)	استفاده از ترکیبات نیمه گرم شده	قبل از آماده‌سازی محلول واکنش، همه اجزاء را به دمای مناسب رسانده سپس دوباره ترکیب نمایید
	خطاهای مرتبط با پیپت کردن در آماده‌سازی محلول‌های استاندارد	برای جلوگیری از خطا، از حجم‌های بالا استفاده نمایید
	خطاهای مربوط به مخلوط کردن محلول واکنش	محلول کار را با استفاده از ورتکس کامل مخلوط نمایید
	تشکیل حباب‌های هوا در چاهک‌ها	محتویات پیپت را به آرامی در چاهک‌ها خالی نمایید
	غلظت محلول استاندارد نادرست است	به دستورالعمل آماده‌سازی رقت‌های استاندارد در پروتکل مراجعه کنید
	خطاهای محاسبات	بعد مراجعه به پروتکل، محاسبات را دوباره انجام دهید
نتایج غیر منتظره	نمونه‌ها در طول موج نادرست خوانده شوند	تنظیمات فیلتر و دستگاه را بررسی نمایید
	نمونه‌ها دارای محتویات مداخله‌گر باشند	در صورت امکان نمونه را بیشتر رقیق نمایید
	خواندن نمونه در بالا و یا زیر محدوده خطی	نمونه‌های غلیظ یا رقیق کرده تا خوانایی آن‌ها در محدوده خطی قرار گیرد

- در صورتی که در انجام هر یک از مراحل آزمایش دچار ابهام، مشکل یا اشتباه شده‌اید، نگران نباشید، تیم پشتیبانی فنی نوند سلامت در کنار شماست. کافی است به شماره تلفن ۰۹۰۱۴۱۱۴۰۹۷ از طریق واتساپ/تلگرام پیام دهید. کارشناسان ما برای رفع مشکل با شما تماس خواهند گرفت.
- نظرات و پیشنهادات مشتریان، همواره پله‌های پیشرفت و بهبود کیفیت را در نوند سلامت تشکیل می‌دهند. لذا در صورت وجود هرگونه نظر، انتقاد یا پیشنهاد، لطفا آن را از طریق ایمیل hi@navandsalamat.com با ما در میان بگذارید.

Copyright © 2020 Navand Salamat. All rights reserved