

## کیت اندازه‌گیری پروتئین به روش برادفورد

### Nadford™ (Protein Assay Kit- Bradford Method)

#### مقدمه:

سنجش پروتئین به روش برادفورد یک روش رنگ‌سنجی سریع، ساده، دقیق و حساس است که برای اندازه‌گیری غلظت پروتئین در نمونه‌های بیولوژیکی به کار می‌رود. اساس روش برادفورد بر تشکیل کمپلکس بین رنگ آبی کوماسی G-250 و پروتئین‌های موجود در محلول استوار است. زمانی که رنگ کوماسی در محیط اسیدی به پروتئین متصل شود، تغییر رنگ از قهوه‌ای یا قهوه‌ای متمایل به آبی و در نتیجه تغییر جذب نوری اتفاق می‌افتد.

روش برادفورد به دلیل داشتن ضریب خاموشی بالای کمپلکس رنگ-پروتئین، حساسیت بالایی در اندازه‌گیری پروتئین دارد. از طرفی اتصال رنگ به پروتئین فرآیند بسیار سریعی بوده (حدود 2 دقیقه) و کمپلکس رنگ-پروتئین برای مدت نسبتاً طولانی (حدود 1 ساعت) در محلول پایدار مانده و رسوب نمی‌کند.

این ویژگی‌ها باعث می‌شود که روش بسیار سریع انجام شود. کیت اندازه‌گیری پروتئین Nadford™، محصول شرکت نوند سلامت روشی ارزان، تکرارپذیر، استاندارد و سازگار با طیف وسیعی از مواد واکنشگر است و برای پروتئین‌های گوناگون در نمونه‌های بیولوژیکی مانند سرم، پلاسما، بافت هموزنه و لیزات سلولی مناسب می‌باشد. این کیت، سنجش پروتئین را به روش رنگ‌سنجی و در طول موج 595 نانومتر انجام داده که اساس آن همان واکنش برادفورد بوده و با استفاده از میکروپلیت ریدر خوانده شده و مبنای گزارش غلظت پروتئین قرار می‌گیرد.

#### آماده‌سازی معرف نادفورد:

یک میلی‌لیتر از **Nadford Reagent 5x** را با 4 میلی‌لیتر آب دیونیزه مخلوط کنید. توجه داشته باشید ماندگاری معرف نادفورد آماده شده در یخچال، به مدت 2 هفته می‌باشد.

#### آماده‌سازی نمونه‌ها:

- نمونه‌های بافتی (بافت هموزنه، لیزات سلولی، گلبول قرمز) را برای حل شدن بهتر پروتئین‌های غشایی و ممانعت از تغییرات پروتئینی در طی واکنش، با معرف **Stabilizing Solution** موجود در کیت به نسبت 1:1 مخلوط کرده و غلظت‌های پروتئین به دست آمده را در فرمول نهایی به عدد 2 ضرب کنید.
- در صورت اندازه‌گیری پروتئین در نمونه‌های ادرار، سرم و پلاسما نیازی به استفاده از **Stabilizing Solution** نمی‌باشد.

#### روش کار

کیت حاضر به دو روش (الف) استاندارد و (ب) میکرو به ترتیب برای غلظت‌های 10 تا 100 و 1 تا 10 میکروگرم پروتئین در نمونه‌ها کاربرد دارد. شما می‌توانید بر اساس میزان پروتئین موجود در نمونه خود یکی از دو روش را انتخاب و استفاده کنید.

تذکر: با توجه به تنوع نمونه‌های بیولوژیکی و افزایش دقت در اندازه‌گیری، پیشنهاد می‌شود در نمونه‌های مجهول، میزان پروتئین 3 نمونه از نمونه‌های خود را با رقت‌های 1، 1:10 و 1:100 در سه تکرار طبق روش کار (از بند 2) سنجیده و میانگین آن‌ها را محاسبه نمایید. با توجه به نتایج به دست آمده از رقت‌ها، رقتی از نمونه‌ها که در بازه 10 تا 100 میکروگرم قرار گرفت را انتخاب و مابقی نمونه‌ها را نیز با همان نسبت رقیق نمایید.

الف: روش استاندارد (بازه پروتئینی 10 تا 100 میکروگرم در میلی‌لیتر) برای شروع آزمایش، 20 میکرولیتر از هر نمونه را به چاهک‌های پلیت اضافه کرده و سپس 200 میکرولیتر از محلول نادفورد آماده شده را به آن اضافه کنید.

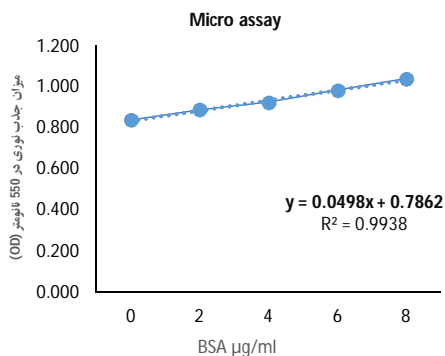
2. پس از مخلوط کردن، به مدت 10 دقیقه در دمای اتاق انکوبه کرده و جذب نمونه را در طول موج  $595 \pm 20$  نانومتر در میکروپلیت ریدر قرائت نمایید. توجه داشته باشید که در این مرحله کمتر از 1 ساعت برای خواندن جذب نوری نمونه‌ها فرصت دارید.

3. جهت تعیین مقادیر دقیق سطوح پروتئین در نمونه‌های مورد آزمایش، منحنی مرجع استاندارد برادفورد (نمودار 1) باید برای هر آزمون، جداگانه آماده شود. بدین منظور غلظت‌های 10 تا 100 میکروگرم از محلول استاندارد موجود در کیت (یک میلی‌گرم در میلی‌لیتر) را با استفاده از جدول زیر آماده نمایید.

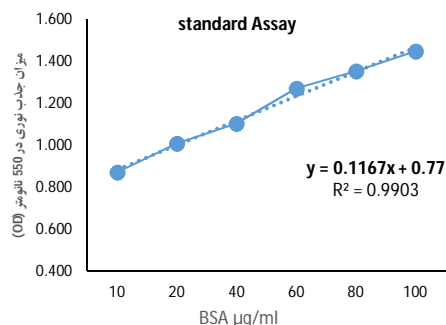
جدول 1. رقت‌های مختلف محلول استاندارد در روش استاندارد

غلظت نهایی (میکروگرم در میلی‌لیتر)	آب مقطر (میکرولیتر)	استاندارد (میکرولیتر)
0	1000	0
10	990	10
20	980	20
40	960	40
60	940	60
80	920	80
100	900	100

4. طبق بند 2 به جای نمونه‌ها، از غلظت‌های مختلف استاندارد تهیه شده طبق جدول 1 استفاده کنید و در نهایت با توجه به اعداد به دست آمده نمودار خط را ترسیم و از فرمول خط برای محاسبه میزان پروتئین در نمونه‌ها استفاده نمایید.



نمودار 2. منحنی استاندارد در روش میکرو



نمودار 1. منحنی استاندارد در روش استاندارد

### محاسبه:

فرمول خط حاصل از غلظت‌های مختلف استاندارد (BSA) به صورت زیر خواهد بود:

$$y = Ax + B$$

$y$ : جذب نوری استاندارد

$A$ : شیب خط (مثال در فرمول نمودار 1 این عدد برابر با 0/1167 می‌باشد)

$x$ : غلظت BSA میکروگرم در میلی‌لیتر

$B$ : عرض از مبدا (مثال در فرمول نمودار روش استاندارد این عدد برابر با 0/77 می‌باشد)

با توجه به فرمول خط حاصل از نمودار روش استاندارد و یا میکرو، میزان پروتئین

در نمونه‌های مجهول را از فرمول زیر محاسبه نمایید:

$$\text{Protein } (\mu\text{g/ml}) = \frac{\text{OD Sample} - B}{A} \times K$$

$K$ : ضریب رقت نمونه

(توجه داشته باشید در صورتی که نمونه‌های بافتی را با معرف **Stabilizing**

**Solution** به نسبت 1:1 مخلوط نموده باشید عدد  $K$  برابر با 2 خواهد بود)

### توصیه‌ها:

- تمام محتویات کیت را به غیر از محلول استاندارد در یخچال (2 تا 8 درجه سانتی‌گراد) نگهداری کنید. محلول استاندارد را در میکروتیوب‌ها تقسیم‌بندی کرده و در دمای 20- درجه سانتی‌گراد (فریزر) نگهداری کنید.
- قبل از استفاده، معرف نادفورد را به دمای محیط (25 درجه سانتی‌گراد) رسانده و بدون استفاده از شیکر، چندین بار مخلوط نمایید.
- پس از تهیه معرف نادفورد، در صورت مشاهده رسوب و یا ذرات، محلول رنگ را با استفاده از کاغذ صافی واتمن شماره 1، فیلتر کرده و سپس از آن استفاده نمایید.
- برای لیز نمونه‌های بافتی نباید از دترجنت‌هایی از قبیل SDS, Triton و NP-40 استفاده شود.
- نوند سلامت به منظور رسیدن به نتایج دقیق‌تر، انجام دوبار تکرار برای نمونه‌ها و استاندارد را توصیه می‌کند.
- در زمان کار با کیت رعایت اصول ایمنی آزمایشگاهی الزامی می‌باشد.

### ب: روش میکرو (بازه پروتئینی 1 تا 10 میکروگرم در میلی‌لیتر)

- برای شروع آزمایش، 100 میکرولیتر از هر نمونه را به چاهک‌های پلیت اضافه کرده و سپس 100 میکرولیتر از محلول نادفورد آماده شده را به آن اضافه کنید.
- پس از مخلوط کردن، به مدت 10 دقیقه در دمای اتاق انکوبه کرده و جذب نمونه را در طول موج  $595 \pm 20$  نانومتر در میکروپلیت ریدر قرائت نمایید. توجه داشته باشید که در این مرحله کمتر از 1 ساعت برای خواندن جذب نوری نمونه‌ها فرصت دارید.
- منحنی مرجع استاندارد برادفورد باید برای هر آزمون جهت تعیین مقدار دقیق سطوح پروتئین در نمونه‌های مورد آزمایش آماده شود. بدین منظور غلظت‌های 2 تا 8 میکروگرم از محلول استاندارد موجود در کیت (یک میلی‌گرم در میلی‌لیتر) را با استفاده از جدول زیر آماده نمایید.

جدول 2. رقت‌های مختلف محلول استاندارد در روش میکرو

غلظت نهایی (میکروگرم در میلی‌لیتر)	آب مقطر (میکرولیتر)	استاندارد (میکرولیتر)
0	1000	0
2	998	2
4	996	4
6	994	6
8	992	8

- پس از تهیه غلظت‌ها طبق روش کار (بند 2) به جای نمونه از غلظت‌های مختلف استاندارد تهیه شده استفاده نموده و در آخر با توجه به اعداد به دست آمده نمودار خط را ترسیم و از فرمول خط برای محاسبه میزان پروتئین در نمونه‌ها استفاده نمایید.