کیت اندازه‌گیری پروتئین به روش برادفورد

Nadford™ (Protein Assay Kit- Bradford Method)

V-0.5

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. زمانی‌که 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 نسبتا طولانی (حدود 1 ساعت) در محلول پایدار مانده و رسوب نمی‌کند. این ویژگی‌ها باعث می‌شود که روش بسیار سریع انجام شود.

کیت اندازه گیری 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 هموژنه 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.

محتوای کیت:

1. **Nadford Reagent**: 2 میلی لیتر (کیت 48 تستی)/ 4 میلی لیتر (کیت 96 تستی) / 8 میلی لیتر (کیت 192 تستی)
2. **Stabilizing solution**: 500 میکرولیتر (کیت 48 تستی)/1 میلی لیتر (کیت 96 تستی) / 2 میلی لیتر (کیت 192 تستی)
3. **Standard Solution**: 500 میکرولیتر (کیت 48 تستی)/1 میلی لیتر (کیت 96 تستی) / 2 میلی لیتر (کیت 192 تستی)

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 هموژنه، لیزات سلولی، گلبول‌قرمز) 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** به‌ترتیب برای غلظت‌های ۱۰ تا ۱۰۰ و ۱ تا ۱۰ 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 ۳ نمونه از نمونه‌های خود را با رقت‌های ۱، ۱:۱۰ و ۱:۱۰۰ 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 بازه۱۰ تا ۱۰۰ میکروگرم قرار گرفت را انتخاب و مابقی نمونه‌ها را نیز با همان نسبت رقیق نمائید.

الف: روش استاندارد (بازه پروتئینی ۱۰ تا ۱۰۰ میکروگرم در میلی‌لیتر)

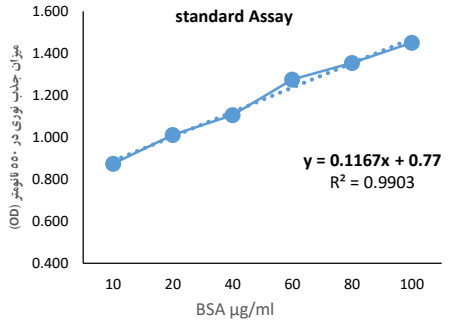
1. برای شروع آزمایش،۲۰ میکرولیتر از هر نمونه را به چاهک‌های پلیت اضافه کرده و سپس ۲۰۰ میکرولیتر از محلول نادفورد آماده شده را به آن اضافه کنید.
2. پس از مخلوط کردن، به مدت ۱۰ دقیقه در دمای اتاق انکوبه کرده و جذب نمونه را در طول موج ۲۰±۵۹۵ نانومتر در میکروپلیت ریدر قرائت نمائید. توجه داشته باشید که در این مرحله کمتر از ۱ ساعت برای خواندن جذب نوری نمونه‌ها فرصت دارید.
3. جهت تعیین مقادیر دقیق سطوح پروتئین در نمونه‌های مورد آزمایش، منحنی مرجع استاندارد برادفورد (نمودار ۱) باید برای هر آزمون، جداگانه آماده شود. بدین منظور غلظت‌های ۱۰ تا ۱۰۰ میکروگرم از محلول استاندارد موجود در کیت (یک میلی‌گرم در میلی‌لیتر) را با استفاده از جدول زیر آماده نمائید.

جدول ۱. رقت‌های مختلف محلول استاندارد در روش استاندارد

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

Navand Lab Kit
تلفن تماس: ۰۹۰۱۴۱۱۴۰۹۷ وبسایت: www.navandsalamat.com ایمیل: navandsalamat@gmail.com
آدرس: ارومیه، کیلومتر ۱۱ جاده سرو، پارک علم فناوری آذربایجان غربی، شرکت نوند سلامت - کدپستی: ۵۷۵۶۱۱۵۳۳۳

4. طبق بند ۲ به جای نمونه‌ها، از غلظت‌های مختلف استاندارد تهیه شده طبق جدول ۱ 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 ۱. منحنی استاندارد در روش استاندارد

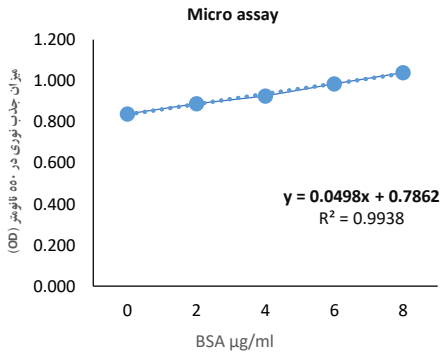
ب: روش میکرو (بازه پروتئینی ۱ تا ۱۰ میکروگرم در میلی‌لیتر)

1. برای شروع آزمایش، ۱۰۰ میکرولیتر از هر نمونه را به چاهک‌های پلیت اضافه کرده و سپس ۱۰۰ میکرولیتر از محلول نادفورد آماده شده را به آن اضافه کنید.
2. پس از مخلوط کردن، به مدت ۱۰ دقیقه در دمای اتاق انکوبه کرده و جذب نمونه را در طول موج ۲۰±۵۹۵ نانومتر در میکروپلیت ریدر قرائت نمائید. توجه داشته باشید که در این مرحله کمتر از ۱ ساعت برای خواندن جذب نوری نمونه‌ها فرصت دارید.
3. منحنی مرجع استاندارد برادفورد باید برای هر آزمون جهت تعیین مقدار دقیق سطوح پروتئین در نمونه‌های مورد آزمایش آماده شود. بدین منظور غلظت‌های ۲ تا ۸ میکروگرم از محلول استاندارد موجود در کیت (یک میلی‌گرم در میلی‌لیتر) را با استفاده از جدول زیر آماده نمائید.

جدول ۲. رقت‌های مختلف محلول استاندارد در روش میکرو

استاندارد (میکرولیتر)	آب مقطر (میکرولیتر)	غلظت نهایی (میکروگرم در میلی لیتر)
0	1000	0
۲	۹۹۸	۲
۴	۹۹۶	۴
۶	۹۹۴	۶
۸	۹۹۲	۸

4. 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.



نمودار ۲. منحنی استاندارد در روش میکرو

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 ۱ این عدد برابر با ۰/۱۱۶۷ می‌باشد)

x : غلظت BSA میکروگرم در میلی‌لیتر

B : عرض از مبدا (مثال در فرمول نمودار روش استاندارد این عدد برابر با ۰/۷۷ می‌باشد)

با توجه به فرمول خط حاصل از نمودار روش استاندارد و یا میکرو، میزان پروتئین در نمونه‌های مجهول را از فرمول زیر محاسبه نمائید:

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

K: ضریب رقت نمونه

(توجه داشته باشید در صورتی که نمونه‌های بافتی را با معرف Stabilizing Solution به نسبت ۱:۱ مخلوط نموده باشید عدد K برابر با ۲ خواهد بود)

توصیه‌ها:

- تمام محتویات کیت را به غیر از محلول استاندارد در یخچال (۲ تا ۸ درجه سانتی‌گراد) نگهداری کنید. محلول استاندارد را در میکروتیوب‌ها تقسیم‌بندی کرده و در دمای ۲۰- درجه سانتیگراد (فریزر) نگهداری کنید.
- قبل از استفاده، معرف نادفورد را به دمای محیط (۲۵ درجه سانتیگراد) رسانده و بدون استفاده از شیکر، چندین بار مخلوط نمائید.
- پس از تهیه معرف نادفورد، در صورت مشاهده رسوب و یا ذرات، محلول رنگ را با استفاده از کاغذ صافی واتمن شماره ۱، فیلتر کرده و سپس از آن استفاده نمائید.

Navand Lab Kit
تلفن تماس: ۰۹۰۱۴۱۱۴۰۹۷ وبسایت: www.navandsalamat.com ایمیل: navandsalamat@gmail.com
آدرس: ارومیه، کیلومتر ۱۱ جاده سرو، پارک علم فناوری آذربایجان غربی، شرکت نوند سلامت - کدپستی: ۵۷۵۶۱۱۵۳۳۳

- برای لیز نمونه‌های بافتی نباید از دترجنت‌هایی از قبیلSDS, 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.

عیب یابی:

مشکل	احتمالات موجود	راه حل های پیشنهادی
عدم کارکرد سنجش یا آزمایش	سرد بودن بافرآزمایش	دمای بافر باید به دمای اتاق رسیده باشد
	عدم رعایت ترتیب مراحل آزمایش	به پروتکل موجود مراجعه کرده و دقیقا پیروی نمایید
	پلیت ریدردرطول موج نادرست	تنظیمات فیلتر دستگاه را چک نمایید
نمونه‌ها با قرائت (خوانش) نامنظم یا نامعقول	نمونه ها در بافرهای متفاوتی تهیه شده باشند	از بافر موجود در کیت استفاده نموده و یا به دستورالعمل موجود در پروتکل مراجعه نمایید
	استفاده ازنمونه های چند بار دفریز شده	اگر نمونه ها چندین بار مورد استفاده قرار خواهند گرفت آن‌های را به دو یا سه قسمت تقسیم نمایید
	وجود ماده‌ی مداخله گر در نمونه	در صورت امکان نمونه را بیشتر رقیق نمایید
	استفاده ازنمونه های قدیمی یا نامناسب	از نمونه‌های تازه استفاده کرده و تا زمان استفاده به درستی نگهداری شود
خوانش بالا / پایین در نمونه ها و استانداردها	دمای نا مناسب ترکیبات	اجازه دهید تمام ترکیبات به دمای اتاق رسیده، سپس به آرامی ترکیب نمایید
	استفاده از کیت منقضی شده و یا نگهداری نامناسب معرف‌ها	تاریخ انقضای کیت را چک نموده و معرف ها را در شرایط مناسب نگهداری نمایید
	استفاده از حجم‌های نامناسب	از سمپلر کالیبره شده استفاده نموده و مواد را تقسیم نمایید
منحنی استاندارد غیر خطی	استفاده از ترکیبات نیمه گرم شده	قبل از آماده سازی محلول واکنش، همه اجزاء را به دمای مناسب رساتده سپس دوباره ترکیب نمایید
	خطاهای مرتبط با پیپت کردن در آماده سازی محلول‌های استاندارد	از حجم های بالا استفاده نمایید
	خطاهای پیپت کردن در محلول واکنش	محلول کار را هر زمان که ممکن است حاضر نمایید
	تشکیل حباب های هوا در چاهک‌ها	محتویات پیپت را به آرامی در چاهک ها خالی نمایید
	غلظت محلول استاندارد نادرست است	به دستورالعمل استاندارد رقت در پروتکل مراجعه کنید
	خطاهای محاسبات	بعد مراجعه به پروتکل ، محاسبات را دوباره انجام دهید
نتایج غیر منتظره	نمونه ها در طول موج نادرست خوانده شوند	تنظیمات فیلتر و دستگاه را بررسی نمایید
	نمونه ها دارای محتویات مداخله گر باشند	در صورت امکان نمونه را بیشتر رقیق نمایید
	خواندن نمونه در بالا / زیر محدوده خطی	نمونه های غلیظ یا رقیق کرده تا خوانایی در محدوده خطی باشند