

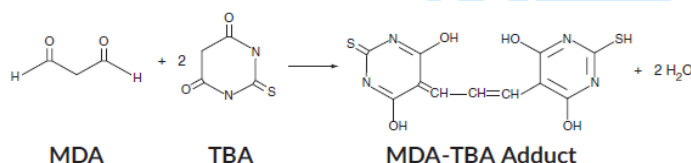


کیت سنجش پراکسیداسیون لیپید (مالون‌دی‌آلدهید) Nalondi™ Lipid Peroxidation (MDA) Assay Kit

مقدمه:

مالون‌دی‌آلدهید همان‌گونه که از نامش پیداست ترکیبی آلدیدی، 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 مالون‌دی‌آلدهید 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 به دست 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 تیوباربیتئوریک اسید (TBA) در دمای بالا، واکنش داده و محصول صورتی رنگی تولید می‌کند که با روش رنگ‌سنجی اندازه‌گیری می‌شود.



محتوای کیت:

- **Lysing Buffer:** ۱۵ میلی‌لیتر (کیت ۴۸ تستی) / ۳۰ میلی‌لیتر (کیت ۹۶ تستی)
- **Acid Reagent:** ۲۵ میلی‌لیتر (کیت ۴۸ تستی) / ۵۰ میلی‌لیتر (کیت ۹۶ تستی)
- **Precipitation Reagent:** ۶/۲۵ میلی‌لیتر (کیت ۴۸ تستی) / ۲۰ میلی‌لیتر (کیت ۹۶ تستی)
- **BHT_{100x}:** ۰/۱ میلی‌لیتر (کیت ۴۸ تستی) / ۰/۲ میلی‌لیتر (کیت ۹۶ تستی)
- **Reagent 1_{2x}:** ۱۰ میلی‌لیتر (کیت ۴۸ تستی) / ۲۰ میلی‌لیتر (کیت ۹۶ تستی)
- **Reagent 2:** ۱۰ میلی‌لیتر (کیت ۴۸ تستی) / ۲۰ میلی‌لیتر (کیت ۹۶ تستی)
- **Reagent 3:** ۱۰ میلی‌لیتر (کیت ۴۸ تستی) / ۲۰ میلی‌لیتر (کیت ۹۶ تستی)
- **Standard solution:** ۱ میلی‌لیتر
- **96-Well plate:** یک عدد

موارد مورد نیاز که در داخل کیت موجود نیست:

- میکروپلیت‌ریدر با قابلیت اندازه‌گیری جذب (OD) ۵۵۰ نانومتر
- پلیت تیره ته‌صاف (در صورت سنجش به روش فلوریمتری)
- 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



مراحل انجام آزمایش:

(۱) آماده سازی نمونه ها:

نمونه های بافتی: به ۱۰ میلی گرم 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 اندازه گیری، نمونه های بافتی در هنگام نمونه برداری باید با PBS خنک کاملاً شستشو داده شوند.

نمونه های سرم/ پلاسما: برای اندازه گیری 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 ته نشین 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.

نمونه های ادرار: تا زمان انجام آزمون، نمونه های 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، می تواند با غلظت کراتینین و یا سایر نشانگرهای مناسب نرمالیزه شود.

(۲) آماده سازی محلول کار:

نیم ساعت قبل از شروع آزمایش معرف ها را به دمای اتاق رسانده و در صورت مشاهده کریستال، معرف ها را تا دمای ۵۰ درجه (توسط بن ماری) گرم کنید و پس از ورتکس استفاده نمایید. معرف R1_{2x} را با آب مقطر دیونیزه به حجم دو برابر برسانید؛ بدین صورت که یک میلی لیتر از R1_{2x} را با یک میلی لیتر آب دیونیزه مخلوط و سپس استفاده نمایید. برای تهیه محلول کار، معرف های R1 (آماده شده)، R2 و R3 را به نسبت های ۱:۱:۲ با هم مخلوط کنید (مثال: دو میلی لیتر از معرف R1 با یک میلی لیتر از معرف R2 و یک میلی لیتر 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:

لوله	استاندارد ۲ میلی مولار (میکرولیتر)	آب مقطر دیونیزه (میکرولیتر)	غلظت نهایی استاندارد (نانومول)
A	۰	۲۰۰	۰
B	۲	۱۹۸	۴
C	۴	۱۹۶	۸
D	۶	۱۹۴	۱۲
E	۸	۱۹۲	۱۶
F	۱۰	۱۹۰	۲۰

✓ **روش کالریمتری:** غلظت استاندارد موجود در کیت ۰/۱ مول می باشد که از آن ۲۰ میکرولیتر برداشته و در ۹۸۰ میکرولیتر آب مقطر دیونیزه رقیق نمائید. غلظت محلول حاصل ۲ میلی مولار بوده و برای رسم منحنی استاندارد طبق جدول روبرو غلظت های مختلف را تهیه نمائید.

✓ **روش فلوریمتری:** 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 میلی مولار است که از آن ۲۰ میکرولیتر برداشته و در ۱۹۸ میکرولیتر آب مقطر رقیق نمائید. غلظت محلول حاصل ۰/۲ میلی مولار و برای تهیه غلظت نهایی استاندارد در سنجش فلورومتری اعداد مربوط به جدول بالا تقسیم بر ۱۰ خواهد شد تا غلظت های ۰، ۰/۴، ۰/۸، ۱/۲، ۱/۶ و ۲ نانومول بدست آید.

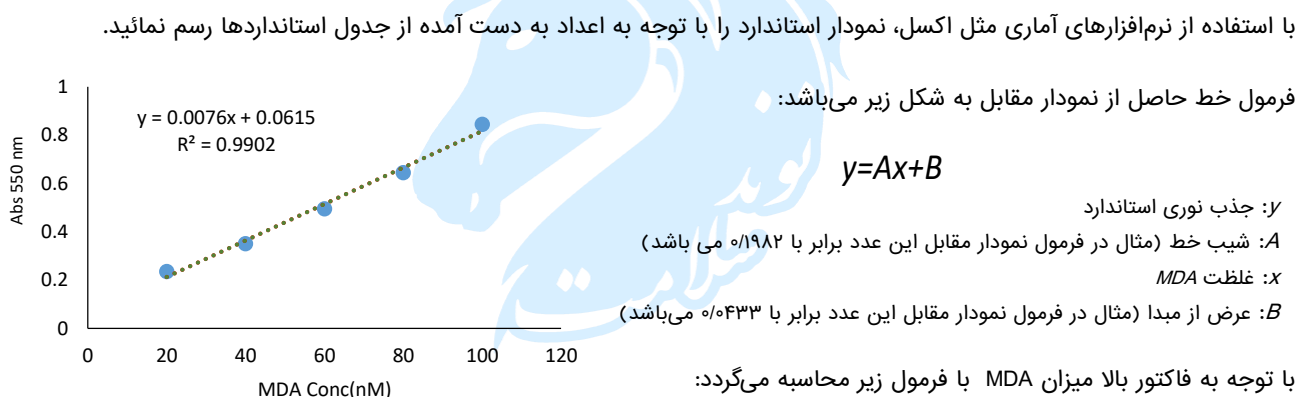


۴) روش کار:

- ✓ 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 در طول موج ۵۵۰ نانومتر قرائت نمایید.
- * 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 به نسبت ۱ به ۹ رقیق کرده‌اید (۱۰۰ میکرولیتر نمونه + ۹۰۰ میکرولیتر آب مقطر)، ضریب K برابر با ۱۰ خواهد بود.

۵) محاسبات:



- mg or ml:** مقدار بافت یا سرم اولیه که برداشته شده است (مثال ۱۰ میلی‌گرم و یا ۰/۱۰ 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)

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

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 گونه‌ای 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 **Nadfred™** نوند سلامت استفاده نمائید.



- هرگونه تغییر در مخلوط کردن، زمان یا دمای انکوبه و زمان مصرف کیت نتایج مختلفی را ارائه خواهد داد لذا توصیه می‌شود در تغییر هر یک از پارامترها، منحنی استاندارد جدیدی رسم شود.
- در صورتی که مقدار جذب نمونه OD بیشتر از بالاترین مقدار استاندارد باشد، نمونه‌ها رقیق شده و مجدداً سنجش انجام گیرد.
- در صورتی که اطلاعاتی از وجود MDA در نمونه بیولوژیکی خود ندارید می‌توانید از طول موج ۴۵۰ نانومتر به جای ۵۵۰ نانومتر استفاده نمایید چرا که آلدئیدها 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 دقیقاً طبق روش کار مندرج در این پروتکل انجام دهید.
- محلول و مواد دیگر را جایگزین محلول و مواد 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	راه‌حل‌های 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 دقیقاً 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 نمونه‌ها 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
خوانش بالا و یا پایین در نمونه‌ها و استانداردها	استفاده از نمونه‌های قدیمی یا نامناسب	ترجیحاً از نمونه‌های تازه استفاده کنید
	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
منحنی استاندارد غیر خطی (با ضریب رگرسیون زیر ۰/۸)	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
	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
نتایج غیر منتظره	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، لطفاً آن را از طریق ایمیل hi@navandsalamat.com با ما در میان بگذارید.