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. 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 ۲ دقیقه) و کمپلکس رنگ-پروتئین برای مدت نسبتا طولانی (حدود ۱ 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 ۵۹۵ 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:

ردیف	دمای نگهداری	نام ماده	۹۶ تست	۱۹۲ تست
۱	2-8 ˚C	**Nadford Reagent**	۵ میلی‌لیتر	۱۰ میلی‌لیتر
۲	2-8 ˚C	**Stabilizer**	۱ میلی‌لیتر	۲ میلی‌لیتر
۳	2-8 ºC	**Standard**	۱ ویال	۲ ویال
۴	-	**96-Well plate**	۱ عدد	۲ عدد

موارد مورد نیاز که در داخل کیت موجود نیست:

- میکروپلیت ریدر با قابلیت خوانش ۵۹۵ نانومتر
- PBS (برای نمونه‌های بافتی)
- هموژنایزر شیشه‌ای (در صورت استفاده از بافت به عنوان نمونه)
- سانتریفیوژ

Copyright © 2022 Navand Salamat. All rights reserved

مراحل انجام آزمایش:

۱) آماده‌سازی محلول‌ها:

Nadford Reagent: Nadford Reagent را به نسبت ۵/۱ با آب دیونیزه مخلوط کنید (برای مثال ۱ میلی لیتر محلول نادفورد را با ۴ میلی لیتر آب دیونیزه مخلوط نمایید).

توجه داشته باشید ماندگاری معرف نادفورد آماده شده در یخچال، به مدت ۲ هفته می‌باشد.

محلول استاندارد: به هر ویال استاندارد (حاوی پودر) ۱ میلی لیتر آب دیونیزه اضافه نمایید. دقت فرمایید که بطور کامل پودر حل شود و از تکان دادن شدید ویال خودداری فرمایید.

تذکر: از محلول استاندارد به دست آمده در طول آزمایش، کنار یخ استفاده کرده و پس از آن محلول استاندارد را به فریزر منتقل نمایید. ماندگاری محلول استاندارد به مدت ۳ ماه در دمای ۲۰- درجه سانتی گراد می‌باشد.

۲) 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 Stabilizer موجود در کیت به نسبت ۱:۱ مخلوط کرده (۱۰ میکرولیتر نمونه بافت هموژنه, لیزات سلولی و یا گلوبول قرمز را با ۱۰ میکرولیتر Stabilizer مخلوط نمایید).
- توجه داشته باشید که غلظت‌های پروتئین به دست آمده را در فرمول نهایی به عدد ۲ ضرب کنید.
- در صورت اندازه‌گیری پروتئین در نمونه‌های ادرار، سرم و پلاسما نیازی به استفاده از Stabilizer نمی‌باشد.

۳) روش کار:

کیت حاضر به دو روش **الف) استاندارد** و **ب) میکرو** به‌ترتیب برای غلظت‌های ۰ تا ۲ میلی گرم در میلی لیتر و ۰ تا ۱۶ میکروگرم در میلی لیتر 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 ۲) سنجیده و میانگین آن‌ها را محاسبه نمایید. با توجه به نتایج به دست آمده از رقت‌ها، رقتی از نمونه‌ها که در بازه ۰ تا ۲ میلی گرم قرار گرفت را انتخاب و مابقی نمونه‌ها را نیز با همان نسبت رقیق نمائید.کیت حاضر به دو روش الف) استاندارد و ب) میکرو به‌ترتیب برای غلظت‌های ۰ تا ۲ میلی گرم بر میلی لیتر و ۰ تا ۱۶ میکروگرم بر میلی لیتر پروتئین در نمونه‌ها کاربرد دارد. شما می‌توانید بر اساس میزان پروتئین موجود در نمونه خود یکی از دو روش را انتخاب و استفاده کنید.

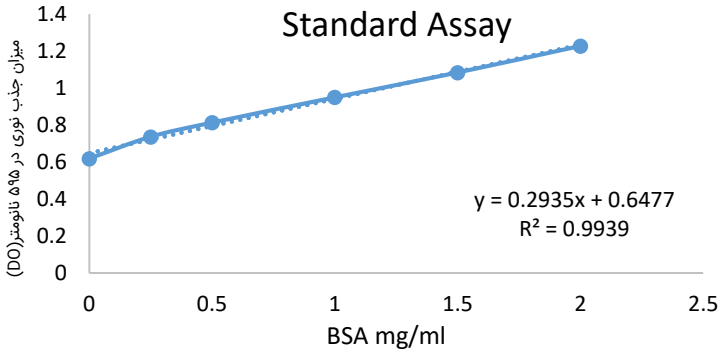
الف: روش استاندارد (بازه پروتئینی ۰ تا ۲ میلی گرم در میلی‌لیتر)

1. برای شروع آزمایش، ۵ میکرولیتر از هر نمونه را به چاهک‌های پلیت اضافه کرده و سپس ۲۵۰ 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 ۰ تا ۲ میلی‌گرم در میلی‌لیتر از محلول استاندارد موجود در کیت (۲ میلی‌گرم در میلی‌لیتر) را با استفاده از جدول زیر آماده نمائید.

Copyright © 2022 Navand Salamat. All rights reserved

جدول ۱. رقت‌های مختلف محلول استاندارد در روش استاندارد

استاندارد (میکرولیتر)	آب مقطر (میکرولیتر)	غلظت نهایی (میلیگرم در میلی لیتر)
۰	۴۰	۰
۵	۳۵	۰/۲۵
۱۰	۳۰	۰/۵
۱۵	۲۵	۰/۷۵
۲۰	۲۰	۱
۳۰	۱۰	۱/۵
۴۰	۰	۲



نمودار ۱. منحنی استاندارد در روش استاندارد

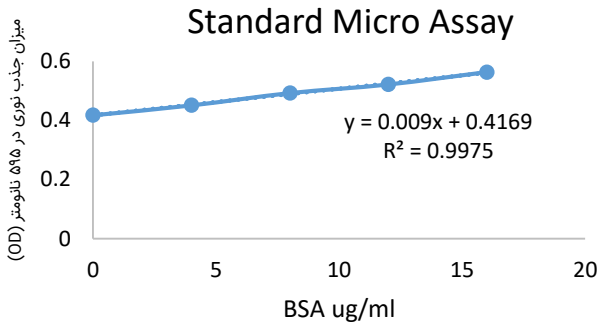
طبق بند ۲ به جای نمونه‌ها، از غلظت‌های مختلف استاندارد تهیه شده طبق جدول ۱ استفاده کنید و در نهایت با توجه به اعداد به دست آمده نمودار خط را ترسیم و از فرمول خط برای محاسبه میزان پروتئین در نمونه‌ها استفاده نمایید.

ب: روش میکرو (بازه پروتئینی ۰ تا ۱۶ 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 ۵۹۵±۲۰ 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 ۰ تا ۱۶ میکروگرم در میلی لیتر از محلول استاندارد موجود در کیت (۲ 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)
۰	۱۰۰۰	۰
۲	۹۹۸	۴
۴	۹۹۶	۸
۶	۹۹۴	۱۲
۸	۹۹۲	۱۶



نمودار۲. منحنی استاندارد در روش میکرو

4. پس از تهیه غلظت‌ها طبق روش کار (بند ۲) 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.

Copyright © 2022 Navand Salamat. All rights reserved

۴) 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 ۱** 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)

۵) 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.
- 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.

Copyright © 2022 Navand Salamat. All rights reserved

۶) عیب‌یابی:

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 ریدر در طول موج نادرست	تنظیمات فیلتر دستگاه را چک نمایید
نمونه‌ها با قرائت (خوانش) نامنظم یا نامعقول	نمونه‌ها در بافرهای متفاوتی تهیه شده باشند	از بافر موجود در کیت استفاده نموده و یا به دستورالعمل موجود در پروتکل مراجعه نمایید
	استفاده از نمونه‌های چند بار دفریز شده	اگر نمونه‌ها چندین بار مورد استفاده قرار خواهند گرفت آن‌های را به دو یا سه قسمت تقسیم نمایید
	وجود ماده‌ی مداخله‌گر در نمونه	در صورت امکان نمونه را بیشتر رقیق نمایید
خوانش بالا / پایین در نمونه ها و استانداردها	استفاده از نمونه‌های قدیمی یا نامناسب	از نمونه‌های تازه استفاده کرده و تا زمان استفاده به درستی نگهداری شود
	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 معرف‌ها را در شرایط مناسب نگهداری نمایید
منحنی استاندارد غیر خطی	استفاده از حجم‌های نامناسب	از سمپلر کالیبره شده استفاده نموده و مواد را تقسیم نمایید
	استفاده از ترکیبات نیمه گرم شده	قبل از آماده سازي محلول واکنش، همه اجزاء را به دمای مناسب رساتده سپس دوباره ترکیب نمایید
	خطاهای مرتبط با پیپت کردن در آماده‌سازی محلول‌های استاندارد	از حجم‌های بالا استفاده نمایید
	خطاهای پیپت کردن در محلول واکنش	محلول کار را هر زمان که ممکن است حاضر نمایید
	تشکیل حباب‌های هوا در چاهکها	محتویات پیپت را به آرامی در چاهک‌ها خالی نمایید
نتایج غیر منتظره	غلظت محلول استاندارد نادرست است	به دستورالعمل استاندارد رقت در پروتکل مراجعه کنید
	خطاهای محاسبات	بعد مراجعه به پروتکل، محاسبات را دوباره انجام دهید
	نمونه‌ها در طول موج نادرست خوانده شوند	تنظیمات فیلتر و دستگاه را بررسی نمایید

- 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 © 2022 Navand Salamat. All rights reserved