KIAZIST

Life Sciences

کیت اندازه گیری محتوای پروتئین کربنیله

Protein Carbonyl Assay Kit

KCAR-96

جهت سنجش 96 نمونه

اصول کار

گروه های کربونیله پروتئین یکی از مارکرهای زود هنگام استرس اکسیداتیو می باشند که در اثر آسیب به پروتئین ها ایجاد می شوند. DNPH با اتصال اختصاصی به این گروه ها منجر به تولید محصول رنگی می شود که در طول موج ۳۷۵ نانومتر جذب دارد.

در این روش اسیدهای نوکلئیک حذف می شوند تا گروه کربونیل آنها با تست مورد نظر تداخل ایجاد ننمایند. در نهایت نمونه توسط محاسبه ضریب جذب تعیین غلظت می شود.

www.kiazist.com

اطلاعات کلی و محتویات

نگهداری و حمل:
در دمای 4˚C و در تاریکی نگهداری شود. حمل توسط یخ مرطوب انجام شود.
حساسیت: 0.15 nmol/1mg BSA (Determined By BCA Assay)

مقدار نمونه پیشنهادی

نمونه	حداکثر	مطلوب
Cells,Tissue,Serum, Urine	20 mg/ml protein	5-20 mg/ml protein

محتویات کیت

شماره	ماده	مقدار/تعداد
1	DNPH Reagent	10 mL
2	100% TCA Solution	3 mL
3	10% Streptomycin Sulphate	1 mL
4	Protein Solvent	20 mL
5	Oxidized BSA (10 mg/mL)	400 µL
6	96-well photometric Plate	1 PC

موارد مورد نیاز اضافی

- سرسمپلر مناسب
- سمپلر مناسب
- سانتریفیوژ دور بالا (13000×g)
- آب دیونیزه
- استون (KIAZIST, KACE100)
- PBS Buffer
- کیت اندازه گیری پروتئین به روش BCA

  (Kiazist, KBCA-96)
- Microplate Reader با طول موج ۳۷۵ نانومتر

نکته: قبل از انجام مراحل آزمایش بر روی نمونه های مورد نظر خود، ابتدا یک نمونه را جهت مشخص ساختن مقدار گروه های کربونیل در نمونه های مورد مطالعه بصورت تست پایلت (pilot) مورد آزمایش قرار دهید.

* قبل از انجام تست، کلیه مراحل انجام آزمایش را بر اساس پروتکل به دقت مطالعه نمایید.

سلول های چسبنده

۱- پس از تریپسـینه کردن سـلول ها می توانید از بافرهای لیزکننده یا چرخه های فریز-دفریز استفاده کرده تا محتوای پروتئین آزاد گردد.

۲- در ادامه، سوسپانسیون لیز شده سلول را به تیوب جدید انتقال داده و در 6000×g به مدت ۱۵ دقیقه و در دمای 4˚C سانتریفیوژ کنید. سوپرناتانت را جدا کرده و تا زمان انجام آزمایش در دمای 80˚C- ذخیره کنید.

سلول های معلق

۱- پس از سانتریفیوژ سلول ها، سوپرناتانت را دور ریخته و از بافرهای لیزکننده یا چرخه های فریز-دفریز استفاده کرده تا محتوای پروتئین آزاد گردد.

۲- در ادامه، سوسپانسیون لیز شده سلول را به تیوب جدید انتقال داده و در 6000×g به مدت ۱۵ دقیقه و در دمای 4˚C سانتریفیوژ کنید. سوپرناتانت را جدا کرده و تا زمان انجام آزمایش در دمای 80˚C- ذخیره کنید.

www.kiazist.com

نمونه بافت

۱۰ میلی گرم ازبافت مورد نظر را هموژن کرده و در 6000×g به مدت ۱۵ دقیقه و در دمای 4˚C سانتریفیوژ کنید. سوپرناتانت را جدا کرده و تا زمان انجام آزمایش در دمای 80˚C- ذخیره کنید.

نمونه های سرم

سرم ها را پس از جداسازی از خون، در دمای 80˚C- ذخیره کنید.

رقت سازی: نمونه ها باید طوری رقیق شوند که به غلظت پروتئین 5-20 mg بر میلی لیتر برسند. در نهایت 100 µL از این محلول که حاوی غلظت 0.5-2 mg خواهد بود برای انجام آزمایش استفاده می شود. این مقدار از پروتئین بسته به نوع مداخله و یا نمونه معادل 0.15-1 nmol از پروتئین کربونیل را شامل خواهد شد.

www.kiazist.com

آماده سازی کیت و استاندارد

DNPH Reagent:

محلول آماده به کار می باشد. دمای مناسب برای عمر بلند مدت (حداقل یک سال) 20˚C- می باشد. از همین رو توصیه می شود پس از آب کردن محلول برای اولین بار، باقیمانده محلول را تقسیم بندی کرده (Aliquot) و مجددا در دمای 20˚C- فریز کنید.

Oxidized BSA:

محلول آماده به کار می باشد. دمای مناسب برای عمر بلند مدت (حداقل یک سال) 20˚C- می باشد. از همین رو توصیه می شود پس از آب کردن محلول برای اولین بار، باقیمانده را تقسیم بندی کرده (Aliquot) و مجددا در دمای 20˚C- فریز کنید.

*بقیه محلول ها همگی آماده به کار می باشند و در دمای 4˚C نگهداری می شوند.

*استون (Acetone) را قبل از شروع آزمایش در دمای 20˚C- قرار دهید تا به دمای یخ برسد.

نحوه انجام آزمایش

- این کیت حاوی BSA اکسیده شده ((Oxidized BSA (10mg/mL به عنوان کنترل مثبت می باشد. در کنار نمونه ها می توان µL 100 از این محلول را جهت تایید تست بکار برد.

۱- پس از رقت سازی نمونه (به بخش آماده سازی نمونه مراجعه شود) به مرحله بعد بروید.

۲- اسیدهای نوکلئیک دارای گروه کربونیل می باشند بنابراین جهت جلوگیری از تداخل باید حذف شوند. از محلول Streptomycin Sulphate 10% به میزان µL 10 به µL 100 نمونه اضافه نمایید و ورتکس کنید. سپس در 6000×g به مدت ۱۵ دقیقه در دمای 4˚C سانتریفیوژ کنید.

۳- سوپرناتانت را جدا کرده و به آن µL 100 از DNPH Reagent اضافه کرده در تاریکی به مدت دقیقا ۱۰ دقیقه انکوبه نمایید.

۴- در ادامه از TCA Solution 100% به مقدار µL 30 به نمونه اضافه کرده و ورتکس کنید. سپس به مدت ۱۵ دقیقه در 6000×g سانتریفیوژ کرده و سوپرناتانت را دور بریزید.

۵- µL 500 از استون سرد شده را به رسوب پروتئین اضافه کرده و ورتکس کنید. سپس در دمای 20˚C- به مدت ۵ دقیقه انکوبه کنید.

۶- در 6000×g به مدت ۱۵ دقیقه و در دمای 4˚C سانتریفیوژ شده و سوپرناتانت دور ریخته شود.

* مرحله ۵ و ۶ را در صورت نیاز به پاکسازی DNPH آزاد تکرار کنید تا سوپرناتانت بیرنگ شود.

۷- درب میکروتیوب ها باز گذاشته تا استون کاملا تبخیر شود.

۸- µL 200 از محلول Protein Solvent را به پلت اضافه کرده و هم بزنید تا کاملا حل شود. در صورتیکه پلت حل نشد به مدت ۱۰ دقیقه در دمای 55˚C انکوبه کنید.

۹- در نهایت µL 150 از محلول فوق را به پلیت 96 خانه انتقال داده و جذب آن را در طول موج ۳۷۵ نانومتر بخوانید. مابقی را جهت سنجش پروتئین در دمای 20˚C- ذخیره کنید.

اندازه گیری پروتئین

برای تک تک نمونه های مورد نظر می بایستی سنجش پروتئین انجام شود.

اندازه گیری مقدار پروتئین برای کمی سازی مقادیرکربونیل الزامیست. روش مناسب اندازه گیری پروتئین برای این روش BCA Assay می باشد. زیرا محلول Protein Solvent که برای حل کردن پلت نمونه ها بکار می رود با این تست سازگار است درحالیکه با روش برادفورد تداخل ایجاد می کند.

- مقدار میانگین جذب بلانک را از هر نمونه کم کنید.
- مقدار پروتئین هر نمونه را برحسب mg/mL حساب کنید.
- بر اساس فرمول زیر عمل کنید:

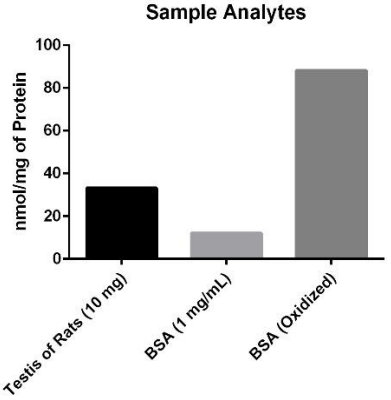
$$C\ (\frac{nmol}{well}) = \frac{OD\ 375\ nm}{6.364} \times 100$$

$$CP = \frac{C}{P} \times \text{Dilution Factor Of Sample}$$

C: مقدار محتوای کربونیل در هر چاهک

P: مقدار پروتئین هر نمونه در مرحله آخر برحسب mg/mL

CP: مقدار نرمال شده محتوای کربونیل برحسب میلی گرم پروتئین



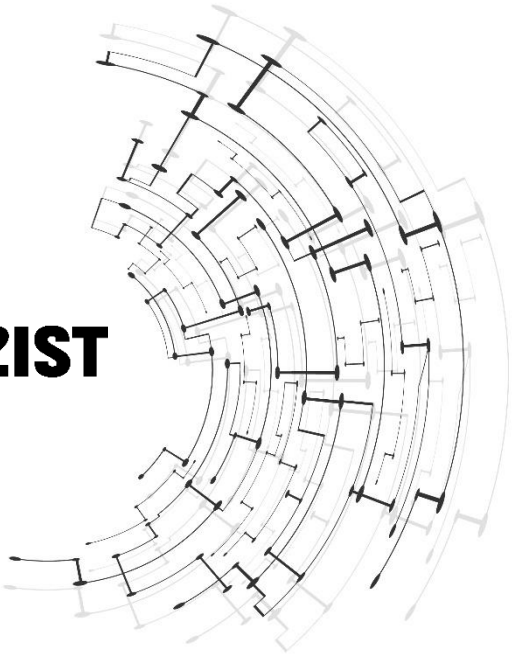
www.kiazist.com

مشکل یابی

مشکل	علت	راه حل
جذب بالا یا پایین	میزان پروتئین بالا	رقت سازی انجام پذیرد تا در میزان پروتئین نمونه در محدوده ۵ تا ۲۰ میلی گرم بر میلی لیتر قرارگیرد.
	میزان پروتئین کم	مقدار نمونه را جهت تهیه لیزات افزایش دهید.
	مواد کیت گرم نشده اند	قبل از شروع مواد کیت گرم شده و یکدست مخلوط شوند
	زمان های انکوباسیون	زمان های انکوباسیون حتما رعایت شوند.
	خطای پیپت	از کالیبره بودن سمپلر خود مطمئن شوید.
نتایج متناقض	وجود رسوب در چاهک ها	رسوب پروتئین را در مرحله آخر کاملا حل نمایید تا رسوب باقی نماند
	طول موج ناصحیح	حتما در طول موج ۳۷۵ نانومتر خوانده شود
	نمونه ها تخریب شده اند	از نمونه تازه استفاده کنید

www.kiazist.com

KIAZIST



www.Kiazist.com

081-3450 8267
0930 402 4884

Info@Kiazist.com