KIAZIST Life Sciences

کیت اندازه گیری

گلیکوزآمینوگلیکان (GAG)

KGAG96

جهت سنجش ۹۶ نمونه

اصول کار

گلیکوزآمینوگلیکان ها (GAG) در ساخت ماتریکس خارج سلولی نقش اساسی دارند. این عناصر سازنده به استحکامات بافتی کمک کرده و در کنار کلاژن منجر به حفظ ساختار ماتریکس خارج سلولی می شوند. بیماری های فیبروزی ، استخوانی و مفصلی می توانند در اثر تغییرات محتوای GAG تغییر کنند. بنابراین بررسی این تغییرات در کنار تغییرات پاتولوژیک می تواند راهگشای نتیجه گیری مطلوب و کمی بررسی این ناهنجاری ها باشد.

در این روش شیمیایی نمونه توسط هضم آنزیمی تجزیه شده و محتوای گلیکوزآمینوگلیکان آن آزاد می شود. سپس در حضور مواد واکنشگر با آن تولید رنگ کرده که در طول موج ۵۶۰-۵۲۵ نانومتر قابل خوانش می باشد.

اطلاعات کلی و محتویات

نگهداری و حمل:
در دمای ٤ درجه سانتیگراد نگهداری شود. حمل توسط یخ مرطوب انجام می شود.

محدوده اندازه گیری دینامیک: 12.5-100 µg/mL
حساسیت: 5 µg/mL

مقدار نمونه پیشنهادی

نمونه	حداکثر	مطلوب
Tissues from animal/plant	30 mg	10 mg
Cells	1.5×10^7	5×10^6 –1×10^7
Serum	30 µl	20 µl

محتویات کیت

شماره	ماده	مقدار/تعداد
1	Diluent Buffer	50 ml
2	Papain Enzyme	2 vials
3	GAG Reagent	20 ml
4	Protein Precipitant	5 ml
5	Chondroitin Sulphate Standard	Powder
6	96-well Clean Plate	1 PCs

موارد مورد نیاز اضافی

- ست سمپلر متغیر
- سرسمپلر مناسب
- میکروتیوب ۱/۵ میلی لیتری
- فور یا هیت بلاکر (Heat Blocker)
- سانتریفیوژ دور بالا (14000 RPM)
- آب دیونیزه

نکته: قبل از شروع با یک نمونه جهت مشخص ساختن مقدار نمونه به صورت پایلت (Pilot) انجام شود.

تمامی پروتکل را قبل از انجام آزمایش مطالعه نمایید.

آماده سازی کیت و استاندارد

آماده سازی مواد کیت:

- پس از آماده سازی نمونه موارد زیر را آماده کنید. محلول ها تا ۲ ساعت پس از آماده سازی پایدار هستند. همه محلولها را در دمای اتاق گرم و خوب هم زده شود.

محلول آنزیمی: ابتدا ۳ میلی لیتر از محلول Diluent Buffer را به ویال Papain Enzyme اضافه کرده و خوب هم بزنید. سپس به یک تیوب تمیز انتقال داده و به حجم نهایی ۲۰ میلی لیتر برسانید. محلول فوق در دمای ٤ درجه تا ۳ ساعت فعال است. جهت استفاده در کارهای بعدی آن را تقسیم بندی کرده و به مدت ٦ ماه در دمای 20°C- ذخیره کنید.

آماده سازی استاندارد:

- به ویال استاندارد ۲ میلی لیتر از Diluent Buffer اضافه کنید تا استاندارد 500 µg/mL حاصل شود. سپس آن را تقسیم بندی کرده و در دمای ºC 20- به مدت ۶ ماه نگه دارید. از آن برای ساخت استانداردها طبق جدول زیر استفاده کنید:

غلظت کندرویتین سولفات (µg/mL)	محلول استاندارد 500 ug/mL (µL)	Diluent Buffer (µL)	حجم نهایی (µL)
۰	۰	۱۰۰	۱۰۰
۱۲/۵	۲/۵	۹۷/۵	۱۰۰
۲۵	۵	۹۵	۱۰۰
۵۰	۱۰	۹۰	۱۰۰
۷۵	۱۵	۸۵	۱۰۰
۱۰۰	۲۰	۸۰	۱۰۰

آماده سازی نمونه

نمونه بافت

۱۰ تا ۲۰ میلی گرم از بافت را توسط سونیکاتور و یا هموژنایزر در 400 µL از محلول آنزیمی لیز کرده و سپس به مدت ۱۶ ساعت در دمای ۶۵ درجه سانتیگراد انکوبه کنید. سپس در 6000×g به مدت ۱۵ دقیقه در 4°C سانتریفیوژ کنید. در این مرحله می توانید مقداری از نمونه را جهت کمی سازی DNA برای نرمال سازس مقادیر به تیوب دیگر منتقل کرده و فریز کنید. دستگاه نانودراپ برای کمی سازی DNA مناسب می باشد.

در ادامه سوپرناتانت را به تیوب جدید انتقال داده و به آن 50 µL از Protein Precipitant اضافه کنید. سپس مجددا در 6000×g به مدت ۱۵ دقیقه سانتریفیوژ کنید. در این مرحله می توانید مقداری از سوپرناتانت را جهت اندازه گیری مقدار DNA با دستگاه نانودراپ ذخیره کنید و برای نرمال سازی استفاده کنید.

سلول های چسبنده

محیط را خالی و سپس سلول ها را تریپسینه کرده و پس از سانتریفیوژ کردن سوپرناتانت را دور ریخته و در در 400 µL از محلول آنزیمی لیز کرده و سپس به مدت ۱۶ ساعت در دمای ۶۵ درجه سانتیگراد انکوبه کنید. سپس در 6000×g به مدت ۱۵ دقیقه در 4°C سانتریفیوژ کنید. در این مرحله می توانید مقداری از نمونه را جهت کمی سازی DNA برای نرمال سازی مقادیر به تیوب دیگر منتقل کرده و فریز کنید. دستگاه نانودراپ برای کمی سازی DNA مناسب می باشد.

در ادامه سوپرناتانت را به تیوب جدید انتقال داده و به آن 50 µL از Protein Precipitant اضافه کنید. سپس مجددا در 6000×g به مدت ۱۵ دقیقه سانتریفیوژ کنید. در این مرحله می توانید مقداری از سوپرناتانت را جهت اندازه گیری مقدار DNA با دستگاه نانودراپ ذخیره کنید و برای نرمال سازی استفاده کنید.

آماده سازی نمونه

سلول های معلق

پس از سانتریفیوژ کردن سوپرناتانت را دور ریخته و در در 400 µL از محلول آنزیمی لیز کرده و سپس به مدت ۱۶ ساعت در دمای ۶۵ درجه سانتیگراد انکوبه کنید. سپس در 6000×g به مدت ۱۵ دقیقه در 4°C سانتریفیوژ کنید. در این مرحله می توانید مقداری از نمونه را جهت کمی سازی DNA برای نرمال سازی مقادیر به تیوب دیگر منتقل کرده و فریز کنید. دستگاه نانودراپ برای کمی سازی DNA مناسب می باشد. در ادامه سوپرناتانت را به تیوب جدید انتقال داده و به آن 50 µL از Protein Precipitant اضافه کنید. سپس مجددا در 6000×g به مدت ۱۵ دقیقه سانتریفیوژ کنید. در این مرحله می توانید مقداری از سوپرناتانت را جهت اندازه گیری مقدار DNA با دستگاه نانودراپ ذخیره کنید و برای نرمال سازی استفاده کنید.

نمونه سرم

خون را در تیوب بدون ضد انعقاد ریخته و به مدت ۳۰ دقیقه در دمای اتاق گذاشته تا لخته شود. سپس در 2500×g به مدت ۲۰ دقیقه سانتریفیوژ کنید . سرم زرد رنگ را بدون آسپیره کردن لایه سفید بافی (لکوسیت) برداشته و به میکروتیوب جدید منتقل نمایید. 100 µL از آن را با 400 µL از محلول آنزیمی ترکیب کرده (ضریب رقت ۵ در نظر بگیرید) و سپس به مدت ۱۶ ساعت در دمای ۶۵ درجه سانتیگراد انکوبه کنید. سپس در 6000×g به مدت ۱۵ دقیقه در 4°C سانتریفیوژ کنید. در این مرحله می توانید مقداری از نمونه را جهت کمی سازی DNA برای نرمال سازی مقادیر به تیوب دیگر منتقل کرده و فریز کنید. دستگاه نانودراپ برای کمی سازی DNA مناسب می باشد. در ادامه سوپرناتانت را به تیوب جدید انتقال داده و به آن 50 µL از Protein Precipitant اضافه کنید. سپس مجددا در 6000×g به مدت ۱۵ دقیقه سانتریفیوژ کنید. در این مرحله می توانید مقداری از سوپرناتانت را جهت اندازه گیری مقدار DNA با دستگاه نانودراپ ذخیره کنید و برای نرمال سازی استفاده کنید.

**نکته: از نمونه همولیز پرهیز شود. نمونه با EDTA مناسب تر است.

نحوه انجام آزمایش

۱. ابتدا به هر چاهک µL 30 از نمونه و یا استاندارد اضافه کنید. توصیه می شود هر نمونه و یا استاندارد را به صورت دوتایی (Duplicate) انجام دهید.

۲. از محلول آنزیمی به عنوان بلانک استفاده کرده و µL 30 از این محلول را به چاهک بلانک اضافه نمایید.

۳. µL 200 از GAG Reagent را به هرچاهک اضافه کنید.

۴. پلیت را در دمای اتاق به مدت ۳۰-۶۰ ثانیه انکوبه کنید.

۵. در نهایت جذب پلیت را در طول موج ۵۱۰-۵۶۰ نانومتر بخوانید.

٦. نکته: زمان خوانش نباید بیشتر از ۱۰ دقیقه شود زیرا رسوب GAG در کنار محلول کروموژن ایجاد می شود.

نحوه محاسبه

۱- مقدار میانگین جذب بلانک را از نمونه ها و استاندارد کم کنید.

۲- با استفاده از یک نرم افزار مناسب مانند اکسل و با استفاده از جذب استانداردها منحنی استاندارد را رسم کنید و غلظت نمونه ها را حساب نمایید.

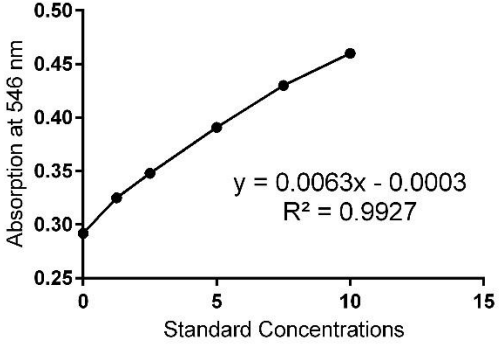
۳- در صورت رقیق نمودن نمونه در ابتدا، ضریب رقت را در عدد نهایی ضرب کنید.

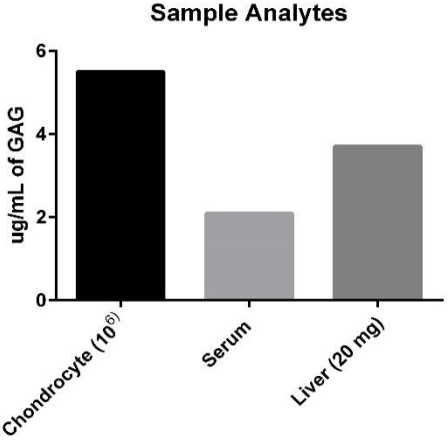
۴- نمونه ها بر حسب µg of GAG/mL بیان می شوند.

۵- جهت نرمال سازی مقادیر بهتر است میزان DNA نمونه ها بعد از هضم محلول آنزیمی سنجیده شود و مقادیر برحسب میکروگرم DNA نرمال سازی شوند.

(µg of GAG/µg of DNA)

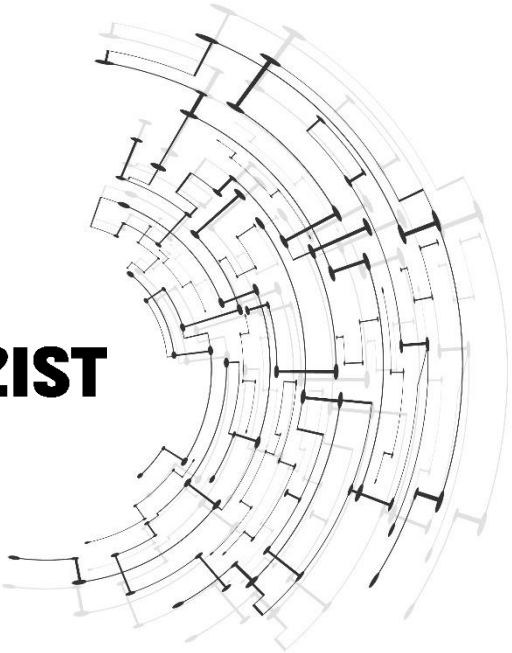
نمونه منحنی استاندارد و تست





مشکل یابی

مشکل	علت	راه حل
جذب بالای منحنی استاندارد	مقدار نمونه اولیه بالا نمونه با GAG بالا	مقدار نمونه اولیه را کم - کنید -رقیق سازی نمونه در Diluent Buffer
جذب پایین منحنی استاندارد	-مقدار نمونه اولیه کم -خراب شدن بافر Chromogen	-مقدار نمونه را افزایش دهید -بافر Chromogen را تازه آماده کنید
-کدورت چاهک -چاهک های آبی رنگ بجای رنگ بنفش	غلظت بالای پروتئین نمونه یا سرم	به صفحه حذف اثر پروتئین مراجعه شود



KIAZIST

www.Kiazist.com

081-3450 8267
0930 402 4884

Info@Kiazist.com