کیت اندازه گیری

هیدروکسی پرولین

KHPA96

جهت سنجش ۹۶ نمونه

اصول کار

هیدروکسی پرولین یکی از اجزای سازنده کلاژن به عنوان اصلی ترین ترکیب ماتریکس خارج سلولی می باشد. این اسید آمینه به طور انحصاری در کلاژن وجود دارد و از این نظر اندازه گیری آن به طور مستقیم نشانگر مقادیر کلاژن را در نمونه می باشد.

اندازه گیری بیوشیمیایی هیدروکسی پرولین یکی از روش های قابل اعتماد و مقرون به صرفه برای تعیین مقدار کلاژن می باشد.

نمونه در حضور یک اسید قوی هضم می شود و پس از اکسیداسیون با کروموژن (Chromogen) واکنش داده و جذب آن در طول موج ۵۶۰-۵۴۰ نانومتر اندازه گیری می شود.

اطلاعات کلی و محتویات

نگهداری و حمل:

در دمای ٤ درجه سانتی گراد نگهداری شود. حمل توسط یخ مرطوب انجام می شود. ویال استاندارد ترجیحا در فریزر نگهداری شود.

محدوده اندازه گیری دینامیک: 7.5-500 µg/ml

حساسیت: 4 µg/ml

مقدار نمونه پیشنهادی

نمونه	حداکثر	مطلوب
Tissues from animal/plant	40 mg	20 mg
Cells	1.5×10^{7}	5×10^{6} –1×10^{7}
Serum	100 µl	50 µl

محتویات کیت

مقدار/تعداد	ماده	شماره
15 ml	Assay Buffer	1
0.6 ml	Oxidant	2
5 ml	Chromogen	3
5 ml	Chromo Buffer	4
Lyophilized	HOP Standard	5
500 mg	Activated Charcoal	6
1 PCs	96-well Clean Plate	7

موارد مورد نیاز اضافی

- ست سمپلر متغیر
- سرسمپلر مناسب
- اسیدکلریدریک (HCl 12M)
- میکروتیوب ۱/۵ میلی لیتری
- فور یا هیت بلاکر (Heat Blocker)
- بن ماری یا هات پلیت (Hot Plate)
- سانتریفیوژ دور بالا (14000 RPM)
- آب دیونیزه

نکته: قبل از شروع، آزمایش توسط تعدادی نمونه جهت مشخص ساختن مقدار حدودی هیدروکسی پرولین در نمونه های مورد بررسی، به صورت پایلوت (Pilot) همراه با استاندارد انجام شود.

*قبل از انجام تست کل پروتکل را به دقت بخوانید.

آماده سازی نمونه

هموژن کردن بافت

۲۰ تا ٤٠ میلی گرم از بافت را به داخل یک میکروتیوب تمیز انتقال داده و در ۱۰۰ میکرولیتر آب دیونیزه هموژن کنید. سپس ۱۰۰ میکرولیتر از 12M HCl به آن اضافه کرده و در دمای ۱۲۰ درجه سانتیگراد به مدت ۳ تا ۴ ساعت انکوبه کنید. درب میکروتیوب ها را محکم ببندید.

سلول های چسبنده

محیط را خالی کرده و سپس سلول ها را تریپسینه نمایید. پس از سانتریفیوژ کردن سوپرناتانت را دور ریخته و ۱۰۰ میکرو لیتر آب دیونیزه به همراه ۱۰۰ میکرولیتر از 12M HCl داخل آن ریخته و در دمای ۱۲۰ درجه سانتیگراد به مدت ۳ ساعت انکوبه کنید. درب میکروتیوب ها را محکم ببندید.

سلول های معلق

سلول ها را سانتریفیوژ کرده، سوپرناتانت را دور ریخته و ۱۰۰ میکرو لیتر آب دیونیزه به همراه ۱۰۰ میکرولیتر از 12M HCl به آنها اضافه نمایید. سپس در دمای ۱۲۰ درجه سانتیگراد به مدت ۳ ساعت انکوبه کنید. درب میکروتیوب ها را محکم ببندید.

**بهتر است جهت نرمال سازی نهایی مقادیر، پس از هموژن کردن نمونه ها، مقداری از آنها را جهت اندازه گیری پروتئین یا DNA برداشته و باقیمانده نمونه را جهت انجام آزمایش مصرف نمایید.

آماده سازی نمونه

نمونه سرم

۱۰۰ میکرو لیتر از نمونه را با ۱۰۰ میکرولیتر از 12M HCl مخلوط نموده و در دمای ۱۲۰ درجه سانتیگراد به مدت ۳ ساعت انکوبه کنید. درب میکروتیوب ها را محکم ببندید. سپس ۵ میلی گرم Activated charcoal را داخل تیوب ریخته و مخلوط نمایید و به مدت ۲ دقیقه در 13000×g سانتریفیوژ کرده و سوپرناتانت را به تیوب جدید انتقال دهید.

-در پایان مرحله آماده سازی برای هر نوع نمونه ای ، درب میکروتیوب های حاوی نمونه ها را باز کرده و اجازه دهید در دمای ۹۰ درجه سانتی گراد بصورت کامل خشک شوند. سپس ۵۰ میکرو لیتر از Assay Buffer را به هر میکروتیوب افزوده و به خوبی مخلوط نمایید. در مرحله بعد به هر نمونه ۵ میلی گرم Activated Charcoal اضافه کرده و کاملا هم بزنید. مخلوط حاصله را در 12000×g به مدت ۱۵ دقیقه سانتریفیوژ نمایید. در پایان از سوپرناتانت حاصله برای انجام مراحل بعدی آزمایش استفاده کنید.

آماده سازی کیت و استاندارد

آماده سازی مواد کیت:

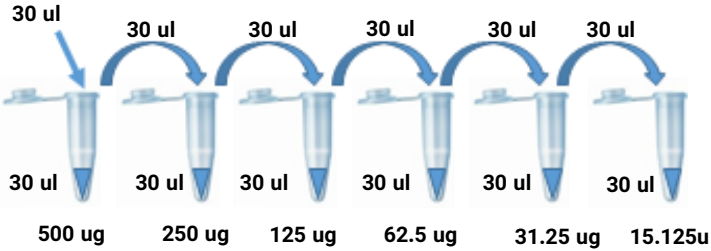
- پس از آماده سازی نمونه موارد زیر را آماده کنید. همه محلول ها را در دمای اتاق گرم کرده و خوب هم بزنید. محلول ها تا ۲ ساعت پس از آماده سازی پایدار هستند.

محلول اکسیداسیون: برای هر نمونه محاسبه شود: 6 ul از Oxidant + 94 ul از Assay Buffer ترکیب شوند و خوب هم زده شوند.

محلول کروموژن: : برای هر نمونه محاسبه شود: 50 ul از محلول Chromogen با 50 ul از ChromoBuffer ترکیب شده و خوب هم زده شوند. این محلول در دمای ۴ درجه رسوب می کند. قبل از مصرف به مدت ۱۰ دقیقه در دمای ۴۰ درجه گرم شود.

آماده سازی استاندارد: به میکروتیوب استاندارد یک میلی لیتر PBS اضافه کرده تا استاندارد 1 mg/mL حاصل شود. سپس به شش میکروتیوب 30 ul آب دیونیزه اضافه کرده و در مرحله بعد از میکروتیوب استاندارد 30 ul به میکروتیوب اول اضافه کرده و خوب هم زده شود. مطابق شکل زیر Serial Dilution تهیه شود.

HOP Stock Standard (1 mg/ml)



نحوه انجام آزمایش

۱. ابتدا به هر چاهک ۲۰ میکرو لیتر از نمونه و یا استاندارد اضافه کنید. توصیه می شود آزمایش هر نمونه و یا استاندارد را به صورت دوتایی (Duplicate) انجام دهید.

۲. از Assay Buffer به عنوان بلانک استفاده کرده و ۲۰ میکرو لیتر از این محلول را به چاهک بلانک اضافه نمایید.

۳. سپس از محلول اکسیداسیون ۱۰۰ میکرو لیتر به هر چاهک اضافه کرده و در دمای اتاق به مدت ۱۵ دقیقه انکوبه نمایید.

۴. در ادامه از محلول کروموژن ۱۰۰ میکرو لیتر به هر چاهک اضافه کرده و در دمای ۶۰ درجه (ترجیحا بن ماری) به مدت ۳۰ تا ۶۰ دقیقه انکوبه نمایید. این زمان بستگی به رنگ دهی چاهک های استاندارد دارد که به رنگ نارنجی مایل به ارغوانی نمایان می شوند.

۵. در نهایت جذب چاهک ها در طول موج ۵۶۰-۵۴۰ نانومتر خوانده شود.

نحوه محاسبه

۱. مقدار میانگین جذب بلانک را از هر نمونه 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 محاسبه نمایید.

۳. محتوی کلاژن قبل از هضم نمونه توسط اسید می تواند بر اساس مقدار DNA یا پروتئین نرمال سازی شود. جهت اندازه گیری DNA می توانید از دستگاه نانودراپ استفاده کنید. در این صورت واحد گزارش به صورت mg of Collagen/µg of DNA or mg of protein گزارش می شود.

۴. در صورتیکه نمونه را رقیق کرده اید ضریب رقت را حتما اعمال نمایید.

۵. عدد نهایی به دست آمده از منحنی (پس از اعمال ضریب رقت) می تواند برحسب نوع کلاژن متفاوت باشد:

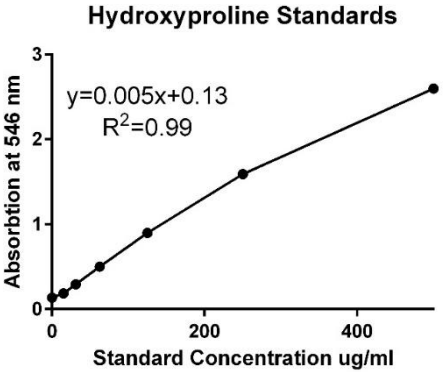
۶. برای کلاژن تیپ II عدد نهایی را در عدد ۷/۴۶ ضرب کنید.

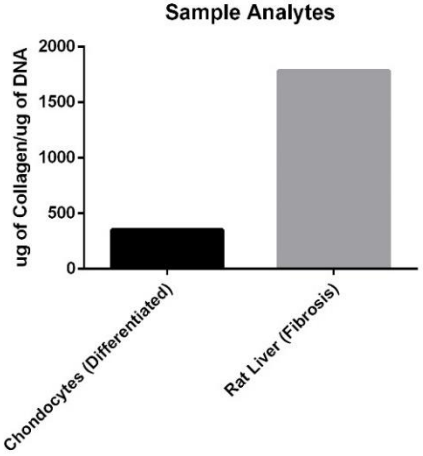
۷. برای سایر کلاژن ها عدد نهایی را در عدد ۱۰ ضرب کنید.

۸. مثال: فرض کنید مقدار نمونه از روی منحنی استاندارد ۲۰۰ میکروگرم بر میلی لیتر بدست آماده است. در این صورت نمونه حاوی ۲۰۰۰ میکروگرم یا ۲ میلی گرم از کلاژن تام می باشد. اما حاوی ۱۴۹۲ میکروگرم کلاژن تیپ II می باشد.

۹. **دقت داشته باشد که این امر در مورد بافت هایی با محتوای کلاژن تیپ II مانند غضروف صدق می کند. برای سایر بافت ها کلاژن تام سنجیده می شود.

نمونه منحنی استاندارد و تست

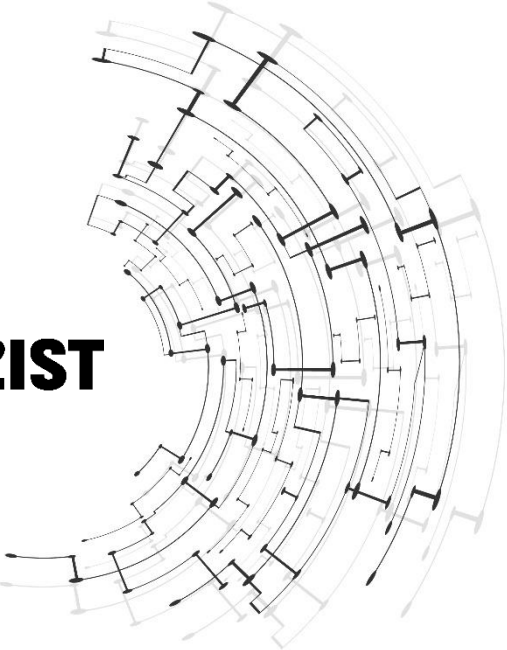




مشکل یابی

مشکل	علت	راه حل
جذب، بالای منحنی استاندارد	مقدار نمونه اولیه زیاد	-مقدار نمونه اولیه را کم کنید -رقیق سازی نمونه در Assay Buffer
جذب، پایین منحنی استاندارد	-مقدار نمونه اولیه کم -خراب شدن بافر Chromogen	-مقدار نمونه را افزایش دهید -بافر Chromogen را تازه آماده کنید -زمان انکوباسیون در ۶۰ درجه را تا ۹۰ دقیقه افزایش دهید

KIAZIST



www.Kiazist.com

081-3450 8267
0930 402 4884

Info@Kiazist.com