کیت اندازه گیری

پراکسیداسیون لیپیدی (MDA)

KMDA-96

جهت سنجش ۹۶ نمونه

اصول کار

مالون دی آلدهید یکی از عواملی می باشد که در اثر پراکسیداسیون لیپیدی و آسیب مستقیم مواد اکسیدانی به اسید های چرب با زنجیره غیر اشباع (PUFA) سلولی ایجاد می شود. بیماری های زیادی مانند آترواسکلروز، دیابت و آلزایمر رابطه مستقیمی با این ماده دارند.

در این آزمایش مالون دی آلدهید با تیوباربیتوریک اسید کمپلکس تشکیل داده و در طول موج نوری 532 nm جذب دارد. همچنین این کمپلکس می تواند جهت افزایش حساسیت بیشتر توسط روش فلوریمتری با مشخصات (Ex/Em=532/553) اندازه گیری شود.

اطلاعات کلی و محتویات

نگهداری و حمل:
در دمای 4 °C و در تاریکی نگهداری شود. حمل توسط یخ مرطوب انجام می شود.
محدوده اندازه گیری دینامیک: 20-100 µM
حساسیت:10 µM

مقدار نمونه پیشنهادی

نمونه	حداکثر	مطلوب
Tissues from animal/plant	30 mg	20 mg
Cells	5×10^6	2×10^6
Plasma	30 µl	20 µl

محتویات کیت

شماره	ماده	مقدار/تعداد
1	MDA Lysis Buffer	25 mL
2	BHT (100X)	1 mL
3	TBA Solution	2 Bottles
4	Phosphotungstic Acid	12.5 mL
5	MDA Standard (6.08 M)	30 µL
6	96-well Clean Plate	1 PCs

موارد مورد نیاز اضافی

- ست سمپلر متغیر
- سرسمپلر مناسب
- استیک اسید خالص (KAA100)
- N-Butanol برای افزایش حساسیت (KNB100)
- سدیم کلرید برای افزایش حساسیت (KNC100)
- اسید سولفوریک برای نمونه پلاسما (KSA100)
- پرکلریک اسید (KPA100) برای نمونه با پروتئین بالا
- کیت BCA کیازیست برای نرمال سازی مقادیر پروتئین (اختیاری)
- میکروتیوب ۱/۵ میلی لیتری و تیوب ۵۰ میلی لیتری
- فور، بن ماری یا هیت بلاکر (Heat Blocker)
- سانتریفیوژ دور بالا (14000 RPM)
- آب دیونیزه با pH=7.0
- کالریمتریک پلیت ریدر با طول موج 532 nm
- فلوریمتریک پلیت ریدر با طول موج (Ex/Em=532/553)

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

*** قبل از انجام تست تمامی پروتکل را مطالعه کنید.**

آماده سازی نمونه

نکات عمومی

-قبل از آزمایش اصلی توصیه می شود به صورت پایلت، آزمایش بر روی یک نمونه انجام شود تا جذب نمونه در محدوده ۰/۱ تا ۱/۵ باشد (محدوده استانداردها).

- نمونه تازه برای این آزمایش توصیه می شود. زیرا مالون دی آلدهید گونه ای ناپایدار می باشد. جهت انجام آزمایش با تاخیر نمونه ها در دمای 80°C- ذخیره شوند. محلول MDA Lysis Buffer را در 45°C به مدت ۱۰ دقیقه گرم کنید تا یکنواخت شود.

هموژن کردن بافت

۱۰ تا ۲۰ میلی گرم از بافت را برداشته و با بافر PBS شستشو دهید. سپس 300 µL از MDA Lysis Buffer را با 3 µL از BHT 100X ترکیب کرده و نمونه را روی یخ با آن هموژن کنید. هموژن حاصل را به مدت ۱۰ دقیقه در 6000×g سانتریفیوژ و سوپرناتانت را جدا کرده به مرحله انجام آزمایش بروید. نمونه های پر پروتئین را طبق صفحه بعد انجام دهید.

سلول های چسبنده و معلق

سلول ها را به میزان مورد نیاز برداشته سانتریفیوژ کنید. پلت حاصل را با PBS شستشو داده و با 300 µL از MDA Lysis Buffer را با 3 µL از BHT 100X ترکیب کرده و نمونه را روی یخ با آن هموژن کنید. هموژن حاصل را به مدت ۱۰ دقیقه در 6000×g سانتریفیوژ کرده و سوپرناتانت را جدا کرده به مرحله انجام آزمایش بروید. نمونه های پر پروتئین را طبق صفحه بعد انجام دهید.

نمونه پلاسما یا سرم

50 µL از پلاسما را به آرامی با 500 µL از اسید سولفوریک 42 mM ترکیب کرده و به آن 125 µL از محلول Phosphotungstic Acid اضافه کنید و به خوبی ورتکس کنید. در درمای اتاق به مدت ۵ دقیقه انکوبه کنید و مخلوط حاصل را حاصل را به مدت ۳ دقیقه در 6000×g سانتریفیوژ کنید. سوپرناتانت را دور ریخته و پلت حاصل را با 200 µL آب دیونیزه حاوی 2 µL از محلول BHT 100X روی یخ دوباره حل کنید.

نمونه با پروتئین بالا

مقدار بافت مورد نظر (حدود ۲۰ میلی گرم) را با 300 uL ازآب دیونیزه حاوی 3 µL از محلول BHT 100X هموژن کنید. هم حجم آن از اسید پرکلریک 2N اضافه کرده به خوبی ورتکس کنید تا پروتئین رسوب کند. سپس آن را به مدت ۱۰ دقیقه در 6000×g سانتریفیوژ کنید و 200 µL از سوپرناتانت آن را برای انجام آزمایش به مرحله بعد ببرید.

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 در دمای اتاق گرم و خوب هم زده شود.

- **MDA Lysis Buffer: در دمای 45 °C گذاشته شود تا تمامی رسوب یکنواخت حل شود. پس از آب شدن تقسیم بندی کرده و دوباره در- 20°C ذخیره شود.**
- **BHT 100X: محلول آماده به کار.**
- **Phosphotungstic Acid: محلول آماده به کار.**
- **TBA Solution: با 9 mL از استیک اسید خالص (گلسیال) ترکیب شود تا محلول کدری حاصل شود. سپس در یک تیوب مدرج حجم نهایی را با آب دیونیزه به 30 mL برسانید. اگر محلول شفافی حاصل نشد از یکی از دو روش زیر اقدام کنید:**
- **آن را در سونیکاتور قرار دهید تا حل شود.**
- **آن را در دمای 60°C قرار دهید تا حل شود و محلول یکدست و شفاف ایجاد کند.**

پس از حل شدن تا یک هفته در دمای 4°C پایدار است.

- **MDA Standard (6.08 M): محلول آماده به کار.**

آماده سازی استاندارد برای روش کالریمتریک:

۱- در یک میکروتیوب از ویال اسـتاندارد 9 µL برداشـته و با 439 µL آب دیونیزه pH=7-7.4 ترکیب کنید تا استاندارد 0.1 M حاصل شود.

۲- از استاندارد 0.1 M مقدار 10 µL برداشته با 490 µL آب دیونیزه pH=7-7.4 ترکیب کنید تا استاندارد 2 mM حاصل شود.

از اسـتاندارد 2 mM بر طبق جدول زیر برای سـاخت منحنی اسـتاندارد اسـتفاده کنید.

شماره	مقدار استاندارد (nmol/mL)	مقدار استاندارد 2 mM (µL)	مقدار آب دیونیزه (µL)
1	0	0	600
2	20	6	594
3	40	12	588
4	60	18	582
5	100	30	570

آماده سازی استاندارد (روش فلوریمتری)

آماده سازی استاندارد برای روش فلوریمتری:

۱- در یک میکروتیوب از ویال استاندارد 9 µL برداشته و با 439 µL آب دیونیزه pH=7-7.4 ترکیب کنید تا استاندارد 0.1 M حاصل شود.

۲- از استاندارد 0.1 M مقدار 10 µL برداشته با 490 µL آب دیونیزه pH=7-7.4 ترکیب کنید تا استاندارد 2 mM حاصل شود.

۳- از استاندارد 2 mM مقدار 10 µL برداشته با 90 µL آب دیونیزه pH=7-7.4 ترکیب کنید تا استاندارد 200 µM حاصل شود.

****از استاندارد 200 µM بر طبق جدول زیر برای ساخت منحنی استاندارد استفاده کنید.**

شماره	مقدار استاندارد (nmol/mL)	مقدار استاندارد 200 µM (µL)	مقدار آب دیونیزه (µL)
1	0	0	600
2	2	6	594
3	4	12	588
4	6	18	582
5	8	24	576
6	10	30	570

نحوه انجام آزمایش

نکات عمومی:

- نمونه ها و استاندارد ها به صورت دوتایی گذاشته شوند (بنا به دلایل آماری).

- از مواد کیت دیگر استفاده نکنید.

- قبل انجام آزمایش، روش کار را تا انتها مطالعه کنید.

- برای افزایش حساسیت آزمایش به پروتکل توجه کنید.

روش انجام

۱- به هر میکروتیوب 200 µL از نمونه یا بلانک و استاندارد اضافه کرده، سپس به هر کدام 600 µL از TBA Solution اضافه کنید.

۲- در آنها را با پارافیلم محکم بسته و به مدت ۶۰ دقیقه در دمای 95°C انکوبه کنید. سپس به مدت ۱۰ دقیقه دردمای اتاق خنک کنید.

*** در صورت مشاهده کدورت نمونه می توان از فیلتر 0.22 µM برای برداشت رسوب استفاده کرد و یا میکروتیوب را به مدت ۵ دقیقه در 6000×g سانتریفیوژ و سوپرناتانت را جدا کرده به مرحله بعد برد.**

۳- 200 µL از سوپرناتانت نمونه یا استاندارد را برداشته به پلیت ۹۶ خانه منتقل کرده و به مرحله ۴ مراجعه کنید.

نکته: برای افزایش حساسیت تست به صفحه بعد بروید.

برای محاسبه خودکار از نرم افزار Curve expert نسخه Basic نیز می توانید محاسبه را انجام دهید

https://www.curveexpert.net/

افزایش حساسیت تست

اگر فکر می کنید میزان مالون دی آلدهید در نمونه شما کم است و رنگ صورتی (یا نارنجی) در نمونه ها قابل تشخیص نیست، از روش زیر اقدام کنید. در غیر این صورت به مرحله ۴ بروید.

- باقیمانده محلول مرحله ۲ را برداشته و به آن 275 µL از N-Butanol اضافه کرده کنید. 75 µL از محلول سدیم کلرید 5M به آن اضافه کنید و به خوبی ورتکس کنید.

- به مدت ۳ دقیقه در 6000×g سانتریفیوژ کرده و فاز رویی که حاوی N-Butanol می باشد را به یک میکروتیوب جدید انتقال دهید.

- میکروتیوب را در دمای 70°C قرار داده و درب آن را باز کنید تا N-Butanol آن تبخیر شود. سپس به آن 200 µL آب دیونیزه اضافه کرده تا رسوب کاملا حل شود. در ادامه آن را به پلیت ۹۶ خانه برای خوانش منتقل کنید. رنگ محلول ها به رنگ نارنجی در می آید.

۴- برای خوانش کالریمتریک پلیت در طول موج ۵۳۲ تا ۵۶۰ قرائت شود. برای خوانش فلوریمتریک پلیت در طول موج با مشخصات (Ex/Em=532/553) خوانده شود.

نکته: برای افزایش حساسیت روش فلوریمتریک پنای باند (Slit Width) به صورت 5 nM باشد و حساسیت دستگاه در بالاترین سطح قرار گیرد.

نحوه محاسبه

۱- مقدار میانگین جذب بلانک (استاندارد ۱) را از میانگین 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 حساب نمایید.

۳- فرمول محاسبه غلظت واقعی

$$\text{MDA Concentration} = \left(\frac{A}{mg\ or\ mL}\right) \times 4 \times D$$

A= nmol غلظت محاسبه شده از نمودار استانداردبه

Mg= مقدار بافت برداشت شده یا مقدار پروتئین سنجیده شده در میلی لیتر

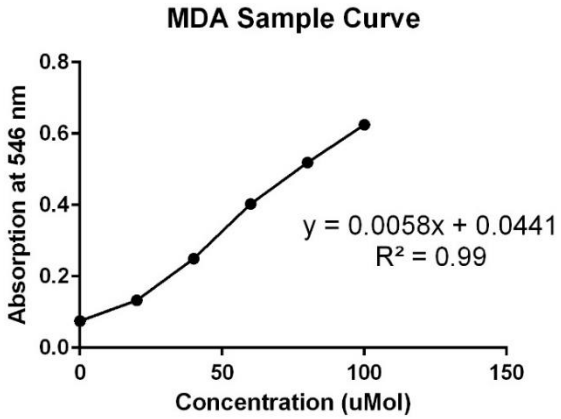
mL= مقدار پلاسما یا سرم برداشته شده بر حسب میلی لیتر

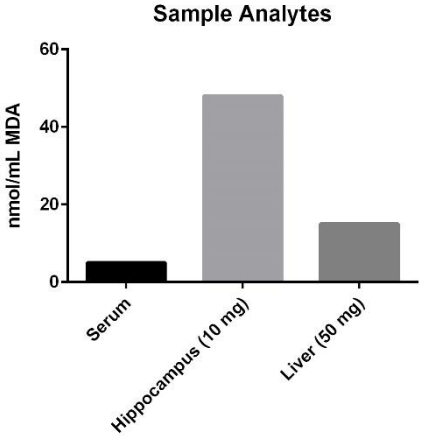
D= ضریب رقت نمونه

4= درصورت استفاده از روش افزایش حساسیت اعمال شود

غلظت محاسبه شده بدون نرمال سازی با پروتئین بر حسب nmol/mL و پس از نرمال سازی با پروتئین برحسب nmol/mg of Protein بیان می شود.

نکته: برای نمونه بافت و سلول روش بهتر برای نرمال سازی مقادیر مالون دی آلدهید بیان غلظت مالون دی آلدهید بر حسب میلی گرم پروتئین می باشد. در فرمول بالا مقدار پروتئین محاسبه شده در میلی لیتر بر حسب میلی گرم بجای mg قرار بگیرد.


MDA Sample Curve
Absorption at 546 nm
0.8
0.6
0.4
0.2
0.0
y = 0.0058x + 0.0441
R² = 0.99
0
50
100
150
Concentration (uMol)


Sample Analytes
nmol/mL MDA
60
40
20
0
Serum
Hippocampus (10 mg)
Liver (50 mg)

مشکل یابی

مشکل	علت	راه حل
آزمایش کار نمی کند	بافرها سرد هستند	به دمای اتاق برسانید
	طول موج اشتباه	از طول موج و فیلترها مطمئن شوید
	استفاده از پلیت ۹۶ خانه دیگر	کالریمتری: پلیت شفاف فلورومتری: پلیت سیاه با کف شفاف
نمونه با جذب غیر مرتبط	پروتئین بالا	به بخش جداسازی پروتئین مراجعه کنید
	نمونه کامل هموژن نشده	زمان و شدت هموژن سازی را افزایش دهید
	نمونه چند بار فریز-دفریز شده است	نمونه را پس از استخراج الیکات کنید
	استفاده از نمونه قدیمی	از نمونه تازه یا ذخیره شده در دمای 80°C- استفاده کنید
	وجود مواد مداخله گر	پروتئین را جدا کنید

مشکل	علت	راه حل
استاندارد خطی نمی شود	ایراد در پیپتاژ کردن مواد	از پیپت کردن حجم کمتر از 5 µL خودداری کنید
	ایجاد حباب در چاهک ها	مواد رابه دیواره و به آرامی منتقل کنید
	غلظت استوک استاندارد درست نیست (2 mM)	به آماده سازی استاندارد مراجعه کنید
خوانش بالا/پایین نمونه	عدم آب شدن کامل نمونه	نمونه ها کاملا آب کرده و هم بزنید
	نمونه غلیظ یا رقیق است	نمونه غلیظ را رقیق کنید نمونه رقیق را در بخش لیوفیلیزه کردن با آب کمتری رقیق کنید
	زمان بیرون گذاشتن نمونه بالا	مواد را آماده کنید بعد نمونه ها را آب کنید
	زمان و دمای غیر استاندارد انکوباسیون	از دمای های ذکر شده استفاده کنید

KIAZIST

www.Kiazist.com

081-3450 8267
0930 402 4884

Info@Kiazist.com