کیت اندازه‌گیری کمّی مالون دی آلدهید

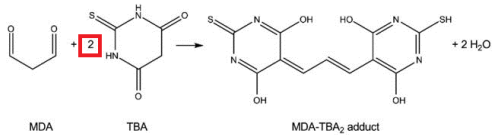
(MDA quantitation kit)

(Cat-No: S1174-100 □, S1174-200 □)

الف) مقدمه

یکی از مکانیسم‌های آسیب سلولی در جانوران و گیاهان پراکسیداسیون لیپیدی می‌باشد. پراکسیدهای لیپیدی شاخص‌های بسیار ناپایداری از استرس اکسیداتیو در سلول‌ها می‌باشد که با تجزیه به ترکیبات واکنش-پذیری مثل مالون دی‌آلدهید (MDA) و ۴-هیدروکسی نئونال (4-HNE) تبدیل می‌شوند. اکسیداسیون لیپیدها در in vitro بواسطه انواع فاکتورهای پرواکسیدانت و در in vivo در اثر بسیاری از بیماری‌ها یا پیری رخ می‌دهد. سنجش محصول نهایی پراکسیداسیون لیپیدی یکی از روشهای مقبول برای اثبات آسیب اکسیداتیو می‌باشد. فراورده‌های آلدهیدی فوق به عنوان مارکرهای استرس اکسیداتیو پذیرفته شده‌اند.

مواد واکنش‌پذیر با تیوباربیتوریک اسید(TBARS) یک سنجش رایج برای نشان دادن پراکسیداسیون لیپیدی می‌باشد. پروتکل حاضر یک روش ساده و سریع در بررسی نمونه‌های دارویی، غذایی، انسانی، جانوری و گیاهی می‌باشد. از نظر مکانیسمی MDA با نسبت ۱:۲ با تیوباربیتوریک اسید ترکیب می‌شود (شکل ۱).



ترکیب MDA-TBA از واکنش MDA موجود در نمونه‌ها با TBA تشکیل می‌شود و می‌توان مقدار آن را با اسپکتروفتومتر اندازه‌گیری کرد. سطح و مقدار TBARS را می‌توان از طریق استاندارد MDA تعیین کرد.

آزمون TBARS اطلاعات وسیعی از فعالیت رادیکال‌های آزاد شده شرایط مختلف از قبیل بیماری‌ها و اثرات پراکسیدانت‌ها و آنتی اکسیدانت بدست می‌دهد. اگرچه اختصاصیت TBARS برای ترکیبات دیگری غیر از MDA بحث برانگیز است اما این روش برای نمایش پراکسیداسیون لیپیدی یک روش پذیرفته شده است. لیپیدهای دارای اسیدهای چرب غیر اشباع مقادیر TBARS بیشتری تولید می‌کنند. TBARS مداخله‌گر محلول موجود در نمونه، را می‌توان با رسوب دادن لیپوپروتئین‌ها توسط اسیدها به حداقل رساند.

نمونه‌های بیولوژیکی ممکن است دارای مخلوط از مواد واکنش‌پذیر با تیوباربیتوریک اسید(TBARS) مثل هیدروپراکسیدها و آلدهید داشته باشند. هرگاه مقادیر TBARS بالایی به دست آمد باید سنجش‌های اختصاصی‌تری از قبیل HPLC بکار گرفته شود.

کیت شرکت آرسام فرا زیست یک سیستم ساده، تکرار پذیر و ارزان قیمت برای بررسی پراکسیداسیون لیپیدی در نمونه‌های ادرار، پلاسما، سرم، لیزات سلولی، هموژنات بافتی و حتی نمونه‌های غذایی مثل کباب، چیپس و سایر سرخ‌کردنی‌ها می‌باشد. همچنین کیت حاضر دارای استاندارد MDA به عنوان کنترل مثبت می‌باشد.

ب) اساس آزمون

آزمون TBARS یک روش کمّی مستقیم در اندازه‌گیری MDA نمونه‌های زیستی می‌باشد. نمونه‌های دارای MDA و استانداردهای MDA ابتدا با TBA در ۹۵ °C واکنش می‌دهند. بعد از چند دقیقه انکوباسیون، نمونه‌ها و استانداردها را می‌توان توسط اسپکتروفتومتر یا فلوریمتر سنجش کرد. مقدار MDA نمونه‌های مجهول را می‌توان با مقایسه آن با منحنی استاندارد MDA تعیین کرد.

ج) محتویات کیت

ردیف	نام ماده یا معرف	مقدار برای ۱۰۰ سنجش	مقدار برای ۲۰۰ سنجش
۱	استاندارد MDA (۱ mM)	۱ ml	۱ ml
۲	تیوباربیتوریک اسید	۵۰ ml	۱۰۰ ml
۳	محلول 100X BHT	۰/۵ ml	۱ ml
۴	بافر لیز	۵۰ ml	۱۰۰ ml
۵	TCA	۲۵ ml	۵۰ ml
۶	کووت پلاستیکی	۲	۲

موادی که در کیت گنجانده نشده است

۱- نمونه‌های مجهول دارای MDA، پلاسما، سرم، ادرار، لیزات سلولی یا بافتی
۲- میکروتیوب و سانتریفیوژ
۳- هیتربلاک، انکوباتور یا حمام آب گرم
۴- n- بوتانول
۵- پلیت ته صاف ۹۶ چاهکی
۶- میکروپلیت ریدر یا اسپکتروفتومتر
۷- فلوریمتر یا میکروپلیت ریدر فلوریمتر دارای توانایی تصحیح در طول موج ۵۴۰ و خوانش نشر ۵۹۰

د) نگهداری کیت

تمامی محتویات کیت بجز استاندارد MDA در ۴° C نگهداری شود. استاندارد MDA در ۲۰- نگهداری شود.

ه) آماده سازی معرف‌ها

محلول1X BHT : آنتی‌اکسیدانت BHT را در غلظت نهایی 1X به هر نمونه بیافزایید تا از اکسیداسیون بیشتر نمونه ها در طی آماده سازی و واکنش TBA جلوگیری شود. برای مثال برای تهیه ml ۱ نمونه کافی است µl ۱۰ از محلول X ۱۰۰ برداشته و به نمونه افزوده شود.

و) آماده سازی نمونه

تمامی نمونه‌ها باید بلافاصله بعد از تهیه سنجش شوند یا اینکه در $-80^{\circ}C$ بمدت ۲-۱ ماه نگهداری شوند.

۱- نمونه بافتی؛ به دلیل اینکه هموگلوبین با آزمون MDA تداخل ایجاد می‌کند بافت باید عاری از خون باشد. نمونه بافت را در بافر لیز دارای 1X BHT حل کنید (۲۰٪ وزنی حجمی: برای مثال ۰/۲ گرم را در حجم نهایی ۱ml در بافر لیز هموژن کنید). بافت را بر روی یخ هموژن نموده و بمدت ۵ دقیقه در g۱۴۰۰۰ سانتریفیوژ کرده و سوپرناتانت را جمع آوری کنید. سوپرناتانت را می‌توان مستقیماً برای تعیین مقدار TBARS یا MDA اندازه-گیری کرد و مقداری از آن (µl ۱۰)را برای **تعیین غلظت پروتئین توسط روش برادفورد یا لوری** استفاده کرد.

۲- نمونه پلاسما؛ به منظور کاهش هموگلوبین و تداخل ناشی از آن نمونه پلاسما بلافاصله بعد از اخذ خون جدا شود. سپس 1X BHT به آن افزوده شود تا دچار اکسیداسیون اضافی نشود. نمونه پلاسما را می‌توان مستقیماً بدون اینکه تحت فرایند خاصی قرار گیرد سنجش کرد.

۳- نمونه سلول؛ سلولها را به مقدار $۱۰^{۷} \times ۲-۱$ سلول در هر میلی لیتر در بافر لیز دارای 1X BHT حل کرده و بر روی یخ سونیکه یا هموژن کنید و بعد از سانتریفیوژ در g ۱۴۰۰۰ به مدت ۵ دقیقه مایع رویی را برای سنجش جمع‌آوری نمایید.

۴- نمونه ادرار؛ به منظور حذف ذرات نامحلول ادرار را در g ۱۴۰۰۰ به مدت ۵ دقیقه سانتریفیوژ کرده و سوپرناتانت را مستقیماً برای سنجش MDA استفاده کنید.

ز) آماده سازی نمونه استاندارد

با رقیق سازی سریالی استاندارد MDA در محدوده غلظتی µM۲۰۰- ۰ در آب دوبار تقطیر یا دیونیزه استانداردهای MDA را مطابق جدول زیر در میکروتیوب‌ها تهیه کنید. لوله شماره ۱۰ بلانک یا کنترل منفی می‌باشد.

نکته؛ توصیه می‌شود استانداردها را با ۲ تکرار تهیه کنید.

استاندارد MDA (µM)	آب (µl)	استاندارد MDA (µl)	استاندارد
۲۰۰	۸۰۰	۲۰۰	۱
۱۰۰	۵۰۰	۵۰۰µl از لوله شماره ۱	۲
۵۰	۵۰۰	۵۰۰µl از لوله شماره ۲	۳
۲۵	۵۰۰	۵۰۰µl از لوله شماره ۳	۴
۱۲/۵۰	۵۰۰	۵۰۰µl از لوله شماره ۴	۵
۶/۲۵	۵۰۰	۵۰۰µl از لوله شماره ۵	۶
۳/۱۳	۵۰۰	۵۰۰µl از لوله شماره ۶	۷
۱/۵۶	۵۰۰	۵۰۰µl از لوله شماره ۷	۸
۰/۷۸	۵۰۰	۵۰۰µl از لوله شماره ۸	۹
۰	۵۰۰	۰	۱۰

ح) روش سنجش

۱) به µl ۵۰۰ از نمونه‌های مجهول و استانداردهای فوق، µl۲۵۰ TCA اضافه نمایید.

نکته؛ در صورتی که حجم نمونه کم باشد به همان میزان بقیه معرف-ها را کم نمایید.

۲) میکروتیوب‌ها را در دمای $95^{\circ}C$ به مدت ۱۰ دقیقه انکوبه کنید و پس از سرد کردن به مدت ۱۰ دقیقه در g ۱۴۰۰۰ سانتریفیوژ نمایید.

۳) µl ۵۰۰ از مایع رویی را برداشته و بر روی آن µl ۵۰۰ محلول TBA بیفزایید و آنها را به مدت ۳۰ الی ۴۵ دقیقه در دمای $95^{\circ}C$ انکوبه کنید.

۴) میکروتیوب‌ها را پس از سرد کردن به مدت ۱۰ دقیقه در g ۱۴۰۰۰ سانتریفیوژ نمایید.

۵) نمونه‌های استاندارد و نمونه‌های مجهول را در طول موج nm ۵۳۲ توسط اسپکتروفتومتر و یا میکروپلیت ریدر قرائت نمایید.

نکته ۱؛ جداسازی توسط بوتانول: برای ممانعت از تداخل هموگلوبین با مشتقات آن جداسازی توسط بوتانول توصیه می‌شود.

الف) µl ۶۰۰ از مایع رویی مرحله ۴ به میکروتیوب دیگر ریخته شود و µl ۶۰۰ n-بوتانول روی آن افزوده شود و بعد از ۲-۱ دقیقه ورتکس در دور g۱۴۰۰۰ به مدت ۵ دقیقه سانتریفیوژ شود.

ب) فراکشن بوتانول را برای آنالیزهای بعدی جمع‌آوری کنید.

نکته ۲: برای خوانش توسط اسپکتروفتومتر از کووت پلاستیکی یا شیشه‌ای استفاده شود.

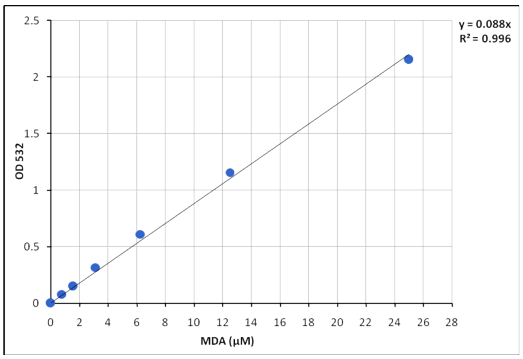
نکته ۳: برای خوانش توسط دستگاه میکروپلیت‌ریدر کافی است ۲۰۰ میکرولیتر از حجم‌های نهایی فوق را به میکروپلیت منتقل کنید و یا اینکه مقادیر مراحل مختلف را به نسبت کم کنید (Scale down).

نکته ۴:برای اندازه گیری فلوریمتر از طول موج تهییجی ۵۴۰nm و طول موج نشری ۵۹۰nm استفاده شود.

ط) تفسیر نتایج

۱) بعد از اخذ داده‌ها توسط اسپکتروفتومتر و یا میکروپلیت ریدر منحنی استاندارد را در برنامه Excel به صورت زیر ترسیم کنید. سپس با به دست آوردن خط برازش (trendline) و معادله آن خط، مقدار x جذب نمونه‌های مورد مطالعه را از معادله خط ساده $y = ax+b$ بدست آورید.

۲) برای بدست آوردن مقدار MDA بر حسب µM/mg pr یا nmol/mg pr مقدار هر نمونه را به مقدار پروتئینی آن تقسیم نمایید. مقدار پروتئین توسط روش برادفورد یا لوری قابل برآورد می‌باشد.



ی) منابع:

1) Zeb A, Ullah F. A Simple Spectrophotometric Method for the Determination of Thiobarbituric Acid Reactive Substances in Fried Fast Foods. Journal of Analytical Methods in Chemistry. 2016;2016:5

2) Khoubnasabjafari M, Ansarin K, Jouyban A. Reliability of malondialdehyde as a biomarker of oxidative stress in psychological disorders. Bioimpacts. 2015;5(3):123-7.

3) Mertens K, Rogiers V, Vercruysse A. Measurement of malondialdehyde in cultures of adult rat hepatocytes. Toxicology in Vitro. 1993 1993/07/01/;7(4):439-41.

ک) رفع اشکال

مشکل	علت احتمالی	راه حل پیشنهادی
۱- **سنجش جواب نمی‌دهد**	۱- بافرهای سنجش سرد هستند ۲- یکی از مراحل سنجش فراموش شده است ۳- طول موج دستگاه صحیح تنظیم نشده است ۴- نوع پلیت ۹۶ چاهکی تفاوت دارد.	۱- قبل از استفاده بافرها در دمای اتاق قرار گیرد ۲- مراحل سنجش بازبینی شود ۳- طول موج دستگاه بررسی شود ۴- برای سنجش‌های کالریمتری از پلیت‌های روشن و برای سنجش‌های فلورسانس پلیت‌های تاریک با ته روشن استفاده شود.
۲- **نمونه‌ها دارای خوانش‌های متغیر هستند**	۱- نمونه‌ها در بافرهای متفاوت تهیه شده اند ۲- نمونه‌های بافتی یا سلولی کاملا هموژن نشده‌اند ۳- نمونه‌ها چندین بار فریز- دفریز شده‌اند ۴- در نمونه‌ها مواد مداخله کننده وجود دارند ۵- نمونه‌ها کهنه هستند	۱- از بافرهای سنجش موجود در کیت استفاده شود ۲- هموژنیزاسیون نمونه تکرار شود ۳- اگر قرار است چند بار از آنها استفاده شود نمونه‌ها را الیکوت کنید ۴- نمونه‌ها رقیق شود ۵- از نمونه‌های تازه استفاده شود
۳- **مقادیر جذب نمونه‌ها و استانداردها کمتر یا بیشتر هستند**	۱- تاریخ انقضای کیت تمام شده ۲- زمان و دمای انکوباسیون متفاوت است ۳- مقادیر حجم‌های متفاوتی استفاده شده است ۴- اجزای کیت به درستی تهیه نشده است	۱- بررسی تاریخ انقضای کیت ۲- زمان و دمای انکوباسیون مطابق کیت باشد ۳- از پیپت‌های کالیبره شده استفاده شود ۴- اجزای کیت را مطابق با دستورالعمل کیت تهیه کنید
۴- **منحنی استاندارد خطی نیست**	۱- خطای پیپت در تهیه استانداردها و مخلوط واکنش ۲- حباب‌های هوا در ول‌ها ۳- غلظت استوک استانداردها صحیح نیست ۴- محاسبات غلط ۵- معرف‌هایی از کیت جایگزین شده است	۱- در پیپت کردن دقت شود ۲- به آرامی پیپت شود یا حباب‌ها از بین برده شود ۳- بر اساس دستورالعمل کیت تهیه شود ۴- بررسی مجدد محاسبات ۵- از معرف‌های همان کیت استفاده شود