# TEB PAZHOUHAN RAZI

# کیت سنجش مالون دی آلدهید (MDA)

# (48/96 تست)

**نگهداری و پایداری**

در دمای 4°C نگهداری شود.

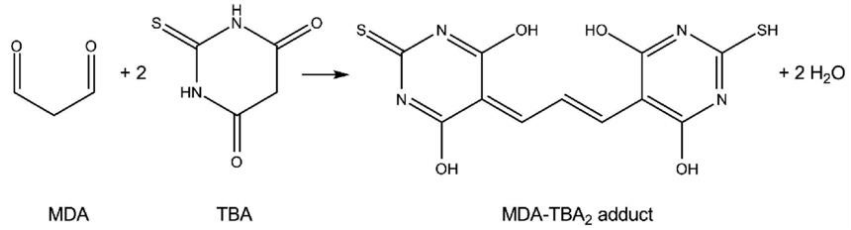
قبل از زمان انقضا استفاده شود.

TECHNICAL SERVICE CONTACT INFORMATION

**Hours:** S-T 8:00 AM to 3:30 PM **Phone:** +98 21 86703137 **Email:** tpr.assist@gmail.com

## درباره کیت

کیت سنجش MDA شرکت طب پژوهان رازی (TPR) ابزاری ا ست که جهت سنجش MDA به عنوان مح صول نهایی پرک سیدا سیون لیپیدی طراحی شده ا ست. MDA موجود در نمونه ها با تیوباربیتوریک ا سید (TBA) واکنش می دهد و ترکیب MDA-TBA را تولید می کند که می تواند به آ سانی با روش های کالریمتری (رنگ سنجی) (530-540 nm) یا فلورومتری (Ex/Em= 532/553 nm) کمی شود. این کیت می تواند جهت اندازه گیری MDA در تمام نمونه های بیولوژیک از جمله پلاسما، سرم، ادرار، هموژن های بافتی و لیزات سلولی به کار رود.




## محتویات کیت

| شماره آیتم | آیتم | کیت 48 تستی | کیت 96 تستی |
|---|---|---|---|
| معرف ۱ (R1) | Thiobarbituric Acid | ۵00 mg | 1000 mg |
| معرف ۲ (R2) | HOAC (5X) | ۱0 ml | 20 ml |
| معرف ۳ (R3) | Alkali (10 X) | ۵ ml | 10 ml |
| معرف ۴ (R4) | Detergent | ۶ ml | 12 ml |
| معرف ۵ (R5) | Standard (500 µM) | 0.5 ml | 1 ml |
| معرف ۶ (R6) | BHT (100 X) | 0.5 ml | 0.5 ml |
| - | میکروپلیت ۹۶ خانه | ۱ پلیت | ۱ پلیت |
| - | دستورالعمل کیت | ۱ دستورالعمل | ۱ دستورالعمل |

## مواد مورد نیاز

- آب مقطر
- میکروتیوب در پیچ دار 1/5 میلی لیتری

## تجهیزات مورد نیاز

- پلیت ریدر (با قابلیت اندازه گیری جذب بین 540-530 nm و یا اندازه گیری فلورسنس با استفاده از طول موج القائی ۵۳۰ nm و طول موج خروجی 550 nm).
- ورتکس میکسر
- دستگاه تولید گرما

## هشدارها و اقدامات احتیاطی

- تیوباربیتوریک اسید بوی قوی مرکاپتان دارد. بخار آن را تنفس نکنید. مراقب باشید که با پوست و چشم تماس نداشته باشد.
- HOAC خورنده است و می تواند سبب سوختگی شود. در صورت تماس با چشم ها، فوراً با مقدار کافی آب شسته شود و به پزشک مراجعه شود. لباس محافظ مناسب پوشیده شود.
- BHT در صورت خورده شدن مضر می باشد و منجر به سوزش چشم، سیستم تنفسی و پوست می شود. در صورت تماس با چشم ها فوراً با مقدار کافی آب شسته شود و به پزشک مراجعه شود. لباس محافظ مناسب پوشیده شود.

## عملکرد کیت

- **محدوده اندازه گیری:** تحت شرایط استاندارد توصیف شده در این دستورالعمل، محدوده اندازه گیری دینامیک این کیت 0-50 µM می باشد.
- **دقت**: نمونه سرم انسانی با تکرار 10 بار، ضریب تغییرات داخل و بین تستی ۶/۷ و ۷/۲ درصد را به ترتیب نشان داد.

## آماده سازی نمونه

علاقه به اندازه گیری MDA توسط محققین، منجر به طراحی شرایط مختلف آزمایشگاهی جهت اندازه گیری MDA در نمونه های مختلف شده است. با این وجود دستورالعمل کلی برای نمونه های مختلف در ادامه توضیح داده شده است.

**نکته بسیار مهم:** تمام نمونه ها باید بلافاصله بعد از جمع آوری آزمایش شوند و یا در -80°C نگهداری شوند. نمونه ها به مدت یک تا دو ماه در -80°C پایدار خواهند بود.

### پلاسما

1. 5 ml خون را همراه با یک ضد انعقاد مانند هپارین، EDTA و یا سیترات جمع آوری کنید.
2. خون را در ۳۰۰۰ x *g* برای مدت ۱۰ دقیقه در 4°C سانتریفیوژ کنید. لایه پلاسما را به دقت جمع آوری کنید.
3. ۵ µl از R6 را با 1 ml پلاسما مخلوط کرده و روی یخ نگهدارید.

**نکته:** مهم است که همولیز در نمونه های پلاسما حداقل باشد.

### سرم

1. 7 ml خون را بدون ماده ضد انعقاد جمع آوری کنید.
2. اجازه دهید که خون برای مدت ۱۰ دقیقه در 25°C منعقد شود.
3. خون را در 3000 x *g* برای مدت 10 دقیقه در 4°C سانتریفیوژ کنید. لایه سرم را به دقت جمع آوری کنید.
4. 5 µl از R6 را با 1 ml سرم مخلوط کرده و روی یخ نگهدارید.

**نکته:** مهم است که همولیز در نمونه های سرم حداقل باشد.

### ادرار

ادرار نیاز به آماده سازی خاصی ندارد، فقط نمونه ها را قبل از آزمایش در 3000 x *g* برای مدت 10 دقیقه در 4°C سانتریفیوژ کنید.

## هموژن های بافتی

1. حدود 100 mg از بافت را وزن کرده و در تیوب 2 ml سانتریفیوژ کنید.
2. 0.9 ml ازمحلول سرد 150 mM KC1 یا PBS حاوی 3 µl از معرف R6 را به نمونه بافت اضافه کنید.
3. بافت را با استفاده از هموژنایزر بر روی یخ هموژنیزه کنید.
4. بافت را بر روی یخ به مدت 15 ثانیه سونیکیت کنید (40 V).
5. در 1600 x *g* برای مدت 10 دقیقه در 4°C سانتریفیوژ کنید و سوپرناتانت را جهت آنالیز استفاده کنید.

**توجه:** هموگلوبین با آزمایش تداخل می کند. بنابراین در صورت وجود خون باید با استفاده از بافر مناسب شستشو داده شود.

**توجه:** غلظت MDA می تواند با وزن نمونه بافت یا غلظت پروتئین هموژن بافتی نرمالیزه شود.

## لیزات سلولی

۱. $1 \times 10^7$ سلول را در 1 ml محیط کشت یا بافری مانند PBS حاوی 5 µl معرف R6 جمع آوری کنید.
۲. سلول ها را بر روی یخ هموژنیزه یا سونیکیت کنید.
3. کل هموژن را مستقیماً جهت آزمایش استفاده کنید. از محیط کشت به عنوان نمونه بلانک استفاده کنید.

# آماده سازی معرف ها / استاندارد ها

## آماده سازی معرف ها

[1] **آماده سازی معرف R2**: ۴۰ ml آب مقطر را به ۱۰ ml از معرف R2 اضافه کنید (کیت ۴۸ تستی)/80 ml آب مقطر را به 20 ml از معرف R2 اضافه کنید (کیت ۹۶ تستی). معرف R2 آماده شده به مدت حداقل 3 ماه در دمای اتاق پایدار خواهد بود.

[2] **آماده سازی معرف R3**: ۴۵ ml آب مقطر را به ۵ ml از معرف R3 اضافه کنید (کیت ۴۸ تستی)/ 90 ml آب مقطر را به 10 ml از معرف R3 اضافه کنید (کیت ۹۶ تستی). معرف R3 آماده شده به مدت حداقل 3 ماه در دمای اتاق پایدار خواهد بود. معرف آماده شده R3 را در ظرف پلاستیکی مناسب مواد خورنده نگهدارید.

[3] **آماده سازی معرف رنگزا**: ۵۰۰ mg از معرف R1 را با ۵۰ ml از معرف آماده شده R2 و ۵۰ ml از معرف آماده شده R3 مخلوط کنید (کیت ۴۸ تستی)/ 1000 mg از معرف R1 را با 100 ml از معرف آماده شده R2 و 100 ml از معرف آماده شده R3 مخلوط کنید (کیت ۹۶ تستی). به آهستگی حرارت دهید تا پودر به طور کامل حل شود. این معرف به مدت 24 ساعت پایدار خواهد بود. محلول رنگی می تواند به همان مقدار مورد نیاز آماده کرد. برای مثال ۲۵۰ mg از معرف R1 را با ۲۵ ml معرف آماده شده R2 و ۲۵ ml معرف آماده شده R3 می توان مخلوط کرد.

## آماده سازی استاندارد

**آماده سازی استاندارد ها جهت روش رنگ سنجی**

250 µl از استاندارد (**R5**) را با 750 µl آب رقیق کنید تا یک استوک 125 µM به دست آید. 8 میکروتیوب تمیز را برداشته و از A تا H برچسب بزنید. مطابق با جدول صفحه بعد داخل هر تیوب از آب مقطر و استوک استاندارد 125 µM را بریزید.

| تیوب | آب مقطر (µl) | MDA (µl) | غلظت MDA (µM) |
|---|---|---|---|
| **A** | 1000 | 0 | **0** |
| **B** | 995 | 5 | **0.625** |
| **C** | 990 | 10 | **1.25** |
| **D** | 980 | 20 | **2.5** |
| **E** | 960 | 40 | **5** |
| **F** | 920 | 80 | **10** |
| **G** | 800 | 200 | **25** |
| **H** | 600 | 400 | **50** |

**آماده سازی استاندارد ها جهت روش فلورومتریک**

25 µl از استاندارد (**R5**) را با 975 µl آب رقیق کنید تا یک استوک 12.5 µM به دست آید. 8 میکروتیوب تمیز را برداشته و از A تا H برچسب بزنید. مطابق با جدول پایین داخل هر تیوب مقداری آب و محلول استوک استاندارد را بریزید.

| تیوب | آب مقطر (µl) | MDA (µl) | غلظت MDA (µM) |
|---|---|---|---|
| **A** | 1000 | 0 | **0** |
| **B** | 995 | 5 | **0.0625** |
| **C** | 990 | 10 | **0.125** |
| **D** | 980 | 20 | **0.25** |
| **E** | 960 | 40 | **0.5** |
| **F** | 920 | 80 | **1.0** |
| **G** | 800 | 200 | **2.5** |
| **H** | 600 | 400 | **5.0** |

## توصیه های مهم

- قبل از شروع آزمایش اجازه دهید تا همه معرف ها به دمای محیط برسند.
- معرف R4 در صورتی که در دمای 2-8°C نگهداری شده باشد، یک ساعت زمان می برد که به دمای محیط برسد. در صورتی که معرف R4 کدر باشد، در دمای 37°C کمی حرارت دهید تا محلول شفاف شود.
- توصیه می شود که نمونه ها و استاندارد ها حداقل دو بار تکرار شوند.
- توصیه می شود که استاندارد ها و نمونه ها بعد از آماده سازی در دمای 4°C نگهداری شوند تا حساسیت و تکرارپذیری افزایش یابد.

## روش انجام آزمایش

1. نمونه ها را خوب بهم بزنید تا هموژن شوند.
2. تیوب های آزمایش را برچسب بزنید.
3. 100 µL از استاندارد/ نمونه را به تیوب مربوطه اضافه کنید.
4. 100 µL از R4 را به همه تیوب ها اضافه کنید و بهم بزنید تا مخلوط شوند و به مدت 5 دقیقه در دمای اتاق انکوبه کنید.
5. 200 µL از معرف رنگزا ی آماده شده را به همه تیوب ها بریزید.
6. درب تیوب ها را ببندید و در یک فوم یا نگهدارنده قرار دهید تا در طول جوشیدن بالای آب نگه داشته شوند.

7. تیوب ها را در آب در حال جوش به مدت یک ساعت قرار دهید.
8. بعد از یک ساعت، تیوب ها را به مدت 10 دقیقه بر روی یخ قرار دهید تا واکنش متوقف شود.
9. تیوب ها را به مدت 10 دقیقه با دور 10,000 x *g* در 4°C سانتریفیوژ کنید.
10. 200 µl از مایع رویی هر میکروتیوب را به چاهک مرتبط در میکروپلیت منتقل کنید.
11. در صورتی که مایع رویی کدورت داشته باشد مدتی در ۳۷ درجه انکوبه کنید تا شفاف شود.
12. جذب را در 530-540 nm و یا فلورسنس را در Ex/Em 530/550 nm بخوانید.

## محاسبات

1. متوسط جذب/فلوروسنس هر استاندارد و نمونه را محاسبه کنید.
2. مقدار جذب/فلورو سنس ا ستاندارد A (0 µM) را از خودش و سایر مقادیر (هر دو نمونه و ا ستاندارد) کم کنید. این جذب/فلورو سنس اصلاح شده می باشد.
3. مقدار جذب/فلوروسنس اصلاح شده هر استاندارد را به عنوان یک تابع از غلظت MDA رسم کنید.
4. مقادیر MDA برای هر نمونه را از منحنی استاندارد محاسبه کنید.

$$\textbf{MDA (µM)} = \left\{ \frac{\text{(Corrected absorbance/fluorescence) - (y-intercept)}}{\text{Slope}} \right\}$$