تالی ژن پارس

کیت سنجش پروتئین تالی-لوری

شماره‌ی سفارش:

TGP-Pr- ۲۰۰۱

کیت ۵۰ تستی

ایران، اصفهان، شهرک علمی و تحقیقاتی اصفهان،

مجتمع تجاری‌سازی، واحد ۱۶

Taligene@yahoo.com

تلفن: ۹۸۳۱۳۳۹۳۲۳۷۳+

۹۸۹۱۳۰۳۹۰۲۸۲+

فکس: ۹۸۳۱۳۳۹۳۲۳۷۴+

http://www.taligene.com

I. مقدمه

روش لوری برای محاسبه‌ی پروتئین کل اولین بار در یکی از معتبرترین مقالات بیوشیمی شرح داده شد (Lowry *و همکاران؛ ۱۹۵۱*). این روش، روشی کالریمتریک بر پایه‌ی یون‌های مس و معرف فولین سیوکالتو برای گروه‌های فنولی است. روش لوری بارها مورد بررسی قرار گرفته و در مواردی اصلاح گردیده است. این تحقیقات در اغلب موارد برای تشخیص چگونگی ایجاد اختلال توسط مواد مداخله‌گر و همچنین چگونگی حل شدن پروتئین‌های نامحلول توسط دترجنت‌ها طراحی شده بودند. مقالات مربوط به این روش عمدتا توسط *Peterson* در سال ۱۹۸۳ بازبینی شده‌اند. این پروتوکل نسخه *Hartree* از روش لوری را شرح خواهد داد. شرکت تالی ژن پارس در این روش به جای ۵ معرف از ۳ معرف استفاده کرده که در واکنش با برخی از پروتئین‌ها شدت رنگ بیشتری را نشان می‌دهد (که نشان دهنده‌ی حساسیت بالاتر است). همچنین راه اندازی آن بسیار آسان تر است و بر مشکل ته نشینی نمک معرف در روش لوری اصلی غلبه کرده است. در نهایت، فرمولاسیون معرف‌ها باعث بهبود شرایط پایداری آن‌ها خواهد شد. این روش تا حدی آسان تر از روش لوری اصلی است و حساسیت روش لوری اصلی را حفظ کرده است.

II. محتویات کیت

محلول‌های این کیت برای انجام ۵۰ تست در نظر گرفته شده است.

دمای مناسب برای نگهداری کیت دمای ٤°C است.

٤. معرف A: یک ویال ٤٥ میلی لیتری حاوی سدیم پتاسیم تارتریت، کربنات سدیم و سدیم هیدروکسید.

مدت ماندگاری: ۲-۳ ماه در محفظه پلاستیکی.

۵. معرف B: یک ویال ۷ میلی لیتری حاوی سدیم پتاسیم تارتریت، سولفات مس و سدیم هیدروکسید.

مدت ماندگاری: ۲-۳ ماه در محفظه پلاستیکی.

۳. معرف C: یک ویال ۱۷ میلی لیتری حاوی فولین سیوکالتوس فنل خالص می‌باشد. جهت آماده سازی آن ۱ میلی لیتر از معرف C را با ۷ میلی لیتر آب مقطر مخلوط نمایید.

مدت ماندگاری: ساخت این محلول به صورت روزانه می‌باشد و نیازی به تنظیم pH ندارد.

۵. معرف D: ٤ ویال و یک بالن ژوژه‌ی ۵ میلی لیتری حاوی ۱۰ میلی‌گرم آلبومین سرم گاوی (BSA).

توضیحات: استاندارد کالیبراسیون حاوی ۲۰۰۰µg آلبومین سرم گاوی (BSA) در هر میلی لیتر آب می‌باشد.

٦. معرف E: یک ویال ۳۰ میلی لیتری حاوی سدیم کلرید.

مدت نگهداری: ۲-۳ ماه در محفظه پلاستیکی.

III. روش استفاده از کیت

با استفاده از جدول ۱ سری استانداردهای پروتئین را بسازید. برای این کار به صورت زیر عمل نمایید:

۱. غلظت‌های مختلف BSA را با استفاده از بافری که برای آماده سازی نمونه استفاده کرده‌اید و یا با معرف E تهیه نمائید.

۲. یک سری رقت از رنج ٤۰ تا ۱٦۰ میکروگرم بر میلی لیتر را با استفاده از استوک تهیه شده بسازید (مطابق جدول ۱).

۳. ۵۰۰ میکرولیتر از نمونه مجهول حاوی پروتئین، یا محلول‌های استاندارد مرحله قبل و یا بافر یا حلالی که برای آماده سازی نمونه استفاده کردید (استاندارد مرجع) را مطابق با مقادیر درج شده در جدول ۱ تهیه نمائید و به آن ٤۵۰ میکرولیتر معرف A اضافه کنید و لوله‌ها را به مدت ۱۰ دقیقه در حمام آب ۵۰°c انکوبه کنید.

٤. دمای لوله‌ها را به دمای اتاق برسانید.

۵. در مرحله‌ی بعد ۵۰ میکرولیتر از معرف B را به هر کدام از لوله‌ها اضافه کرده و مخلوط کنید و به مدت ۱۰ دقیقه لوله‌ها را در دمای اتاق انکوبه کنید.

۶. به سرعت ۱/۵ میلی لیتر معرف C را به هر کدام از لوله‌ها اضافه کرده و مخلوط کنید (معرف c باید بسیار دقیق اضافه گردد، چرا که در شدت رنگ ایجاد شده و در نتیجه‌ی منحنی استاندارد حاصله تاثیر بسزایی دارد).

۷. سپس لوله‌ها را در حمام آب با دمای ۵۰°c در شرایط تاریکی انکوبه کرده و پس از گذشت مدت زمان ۱۰ دقیقه لوله‌ها را از حمام خارج کرده و به دمای اتاق برسانید.

۸. در نهایت جذب خالص نمونه‌های استاندارد را در طول موج ۶۵۰ نانومتر و در کووت‌هایی به قطر ۱ سانتی‌متر بخوانید و نمودار استاندارد را رسم نمائید (رسم نمودار از طریق تغییرات جذب در مقابل غلظت‌های BSA می‌باشد).

۹. پس از رسم نمودار استاندارد از طریق قرار دادن مقادیر جذب-های بدست آمده برای استانداردها در مقابل غلظت پروتئین BSA (میکروگرم پروتئین در هر ۲/۵ میلی لیتر حجم نهایی) غلظت پروتئین نمونه‌ها را می‌توان از طریق این نمودار بدست آورد. واحدها در این پروتوکل مقدار میکروگرم پروتئین در حجم نهایی محلول می‌باشد.

جدول ۱. مواد مورد نیاز برای رسم منحنی استاندراد

شماره‌ی لوله	B	۱	۲	۳	٤	٥	٦	۷
BSA (µlit)	۰	۵۰	۷۵	۱۰۰	۱۲۵	۱۵۰	۱۷۵	۲۰۰
بافر (µlit)	۵۰۰	۴۵۰	۴۲۵	۴۰۰	۳۷۵	۳۵۰	۳۲۵	۳۰۰
معرف A (µlit)	۴۵۰	۴۵۰	۴۵۰	۴۵۰	۴۵۰	۴۵۰	۴۵۰	۴۵۰
معرف B (µlit)	۵۰	۵۰	۵۰	۵۰	۵۰	۵۰	۵۰	۵۰
معرف C (µlit)	۱/۵	۱/۵	۱/۵	۱/۵	۱/۵	۱/۵	۱/۵	۱/۵
حجم نهایی محلول (µlit)	۲/۵	۲/۵	۲/۵	۲/۵	۲/۵	۲/۵	۲/۵	۲/۵
غلظت نهایی پروتئین	۰	۴۰	۶۰	۸۰	۱۰۰	۱۲۰	۱۴۰	۱۶۰

IV. نتایج

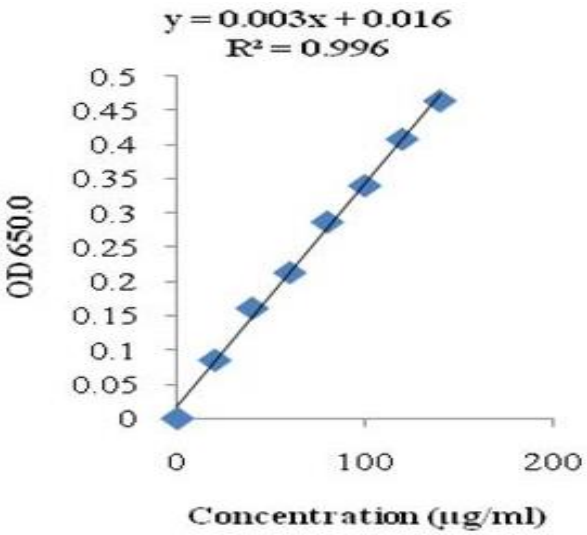
پس از تعیین میزان جذب نوری استانداردها، نمونه‌ها و ترسیم منحنی استاندارد، غلظت پروتئین کل مجهول را می توان با استفاده از فرمول (معادله‌ی خط) محاسبه کرد. محور Y ها شاخص میزان جذب نور استانداردهای پروتئین (BSA) در طول موج ۶۵۰ نانومتر و محور X ها شاخص غلظت استانداردهای (BSA) بر حسب µg/ml است.

$$y = ax + b$$

که a شیب خط و b عرض از مبدا می‌باشد. به طور مثال در منحنی استاندارد زیر

a= ۰/۰۰۳
b=۰/۰۱۶

می‌باشد.



نمودار ۱. منحنی استاندارد BSA

توجه: نتایجی که در نمودار بالا آمده فقط مثال هستند و نباید برای تفسیر نتایج از آن‌ها استفاده شود.

V. منابع

۱. Lowry O.H., Rosebrough N., Farr A., Rundall R. (1951), Protein measurement with folin phenol reagent. Journal of Biology and Chemistry, 193(3) :265-275 .

۲. Peterson G.L. (1977), A simplification of the protein assay method of Lowry et al. which is more generally applicable. Analytical Biochemistry, 83(2):346-356.

۳. Legler, G., et al. (1985), On the chemical basis of the Lowry protein determination. Analytical Biochemistry, 150:267-287.

یادداشت

.....
.....
.....
.....
.....
.....
.....
.....
.....
.....
.....
.....
.....
.....
.....
.....
.....
.....