

کیت سنجش غلظت پروتئین (روش لوری)

Lowry Protein Assay Kit

الف) مقدمه

روش لوری یکی از متداولترین و قدیمی ترین روشهای اندازه گیری غلظت پروتئین تام در یک محلول است که در سال ۱۹۵۱ توسط الیور لوری ارایه گردیده است. روش لوری مشابه روش بیوره بوده، با این تفاوت که مراحل، معرف ها و حساسیت تشخیصی روش لوری بیشتر است. در این روش ابتدا در محیط قلیایی، پروتئین با سولفات مس و تارتارات واکنش داده و کمپلکسی را با چهار پیوند پپتیدی تشکیل می دهد. در مرحله بعد، کمپلکس تشکیل شده به همراه زنجیره جانبی اسیدهای آمینه تیروزین، تریتوفان و تاحدودی سیستئین با معرف فولین (فسفومولبیدیک/فسفوتنگستیک اسید) واکنش داده و باعث احیای آن و تولید رنگ آبی تیره در محدوده ۶۵۰ و ۷۵۰ نانومتر می گردد. حد تشخیص روش لوری بین ۵-۱۰۰ میکروگرم می باشد.

مانند سایر روش های سنجش غلظت پروتئینی، تغییر رنگ حاصله تحت تاثیر ترکیبات موجود در بافر نمونه است. یونهای پتاسیم، منیزیم، آمونیوم، EDTA، Tris-HCl، عوامل احیا کننده، غلظت بالای دترجنت ها و کربوهیدراتها از عوامل مداخله گر با روش لوری محسوب می شوند.

غلظت پروتئین عموماً به کمک استانداردهای متداول پروتئینی تعیین و گزارش می شود در این کیت از آلبومین سرمی گاو (BSA) به عنوان پروتئین استاندارد استفاده شده است. منحنی سری رقت های BSA با غلظت های معلوم ترسیم می گردد سپس غلظت پروتئین مجهول بر اساس منحنی استاندارد مشخص می گردد.

ب) محتویات کیت

ردیف	نام ماده	۱۰۰ واکنش	توضیحات
۱	محلول A	۲۰ ml	آماده مصرف
۲	محلول B	۲ ml	آماده مصرف
۳	معرف فولین	۴ ml	برای تهیه محلول کاری، ۰/۵ میلی لیتر از معرف فولین را با ۷/۵ میلی لیتر آب دوبار تقطیر مخلوط نمایید. این محلول بایستی تازه تهیه شده و دور از نور نگهداری گردد.
۴	آلبومین سرم گاوی	۵ mg	برای تهیه غلظت ۱ mg/ml BSA محتویات ویال را در ۵ ml آب دو بار تقطیر حل نموده و استوک نمایید.

ج) نگهداری

محتویات کیت بجز BSA (۲۰-) در یخچال نگهداری گردد.



د) ترسیم منحنی استاندارد

۱) پروتکل لوله آزمایش

ابتدا غلظت ۰/۱ mg/ml محلول استاندارد BSA تهیه کنید. بدین منظور کافی است از غلظت استوک فوق (۱ mg/ml) یک به ده رقت سازی نمایید. سپس بر اساس جدول زیر در میکروتیوب یا لوله آزمایش شیشه‌ای مقادیر زیر را تهیه کنید.

غلظت BSA(μg/ml) نهایی	۰ (بلانک)	۱۰	۲۰	۳۰	۴۰	۵۰	۶۰	۷۰	۸۰	۹۰	۱۰۰
ddH ₂ O (μl)	۲۰۰	۱۸۰	۱۶۰	۱۴۰	۱۲۰	۱۰۰	۸۰	۶۰	۴۰	۲۰	۰
BSA (μl)	۰	۲۰	۴۰	۶۰	۸۰	۱۰۰	۱۲۰	۱۴۰	۱۶۰	۱۸۰	۲۰۰

- به هر یک از نمونه‌های فوق ۱۸۰ μl محلول A افزوده و در ۵۵ °C به مدت ۱۰ دقیقه انکوبه نمایید.
- بعد از سرد کردن لوله‌ها ۲۰ μl از محلول B به هر یک از نمونه‌ها اضافه نموده و ۱۰ دقیقه در دمای اتاق انکوبه نمایید.
- سپس ۶۰۰ μl معرف فولین کاری به نمونه‌ها اضافه کرده و پس از ۱۰ دقیقه جذب آنها را در طول موج ۶۵۰ نانومتر قرائت نمایید.

نکته: توصیه می‌شود برای هر یک از غلظت‌های فوق حداقل دو تکرار انجام شود.

۲- پروتکل میکروپلیت

برای ترسیم منحنی استاندارد به روش میکروپلیت به صورت زیر عمل شود

غلظت BSA(μg/ml) نهایی	۰ (بلانک)	۱۰	۲۰	۳۰	۴۰	۵۰	۶۰	۷۰	۸۰	۹۰	۱۰۰
ddH ₂ O (μl)	۵۰	۴۵	۴۰	۳۵	۳۰	۲۵	۲۰	۱۵	۱۰	۵	۰
BSA (μl)	۰	۵	۱۰	۱۵	۲۰	۲۵	۳۰	۳۵	۴۰	۴۵	۵۰

- به هر یک از نمونه‌های فوق ۴۵ μl محلول A افزوده و در ۵۵ °C به مدت ۱۰ دقیقه انکوبه نمایید.
- بعد از سرد کردن لوله‌ها ۵ μl از محلول B به هر یک از نمونه‌ها اضافه نموده و ۱۰ دقیقه در دمای اتاق انکوبه نمایید.
- سپس ۱۵۰ μl معرف فولین کاری به نمونه‌ها اضافه کرده و پس از ۱۰ دقیقه جذب آنها را در طول موج ۶۵۰ نانومتر قرائت نمایید.



ه) روش کار سنجش نمونه

خلاصه روش کار در جدول زیر آورده شده است اما مشروح آن در ادامه بیان شده است.

نمونه	بلانک	
۱۵۰	۲۰۰	آب دوبار تقطیر
۵۰	۰	نمونه
۱۸۰	۱۸۰	محلول A
انکوباسیون در ۵۵°C به مدت ۱۰ دقیقه		
۲۰	۲۰	محلول B
انکوباسیون در دمای اتاق به مدت ۱۰ دقیقه		
۶۰۰	۶۰۰	معرف کاری فولین
انکوباسیون در ۵۵°C به مدت ۱۰ دقیقه		

- برای تعیین غلظت پروتئین در نمونه‌ها، مقدار ۵۰ میکرولیتر از هر نمونه سلولی را با آب دوبار تقطیر به حجم ۲۰۰ μl رسانده، و پس از افزودن ۱۸۰ میکرولیتر محلول A به مدت ۱۰ دقیقه در حمام ۵۵°C انکوبه نمایید.

- بعد از سرد کردن نمونه‌های مرحله قبل در دمای آزمایشگاه، مقدار ۲۰ میکرولیتر از محلول B را به هر لوله اضافه و به مدت ۱۰ دقیقه در دمای آزمایشگاه انکوبه کنید.

- مقدار ۶۰۰ میکرولیتر از محلول C را به هر نمونه اضافه و در دمای ۵۵ درجه سانتی‌گراد به مدت ۱۰ دقیقه انکوبه شود.

- بعد از سرد کردن، میزان جذب نمونه‌ها را در طول موج ۶۵۰ نانومتر قرائت گردد.

نکته ۱: برای بلانک تمامی موارد ذکر شده در بالا انجام شود و تنها به جای نمونه، ۲۰۰ میکرولیتر آب دوبار تقطیر استفاده شود.

و) محاسبه غلظت نهایی پروتئین از روی عدد جذب

به منظور بدست آوردن غلظت پروتئین هر نمونه از منحنی استاندارد BSA استفاده شود. با ترسیم مقادیر استاندارد بر علیه عدد جذب آنها منحنی استاندارد به دست می‌آید. بعد از ترسیم نمودار، برازش خطی (Trendline)، معادله خط و ضریب رگرسیون را نیز بر روی نمودار به دست بیاورید. با جایگزینی عدد جذب به جای Y مقدار X را محاسبه نموده و آنرا به ضریب رقت (در کیت حاضر عدد ۴) ضرب نمایید. واحد غلظت پروتئین $\mu\text{g/ml}$ می باشد.

نکات:

(۱) توجه شود با هر دستگاهی که نمونه‌های منحنی استاندارد قرائت می‌شود با همان دستگاه جذب نمونه مجهول خوانده شود.



۲) توجه شود که جذب نمونه های استاندارد بیشتر از عدد ۸/۰ نباشد.

۳) در صورتیکه مقدار جذب نمونه پروتئینی مجهول بیشتر از عدد ۸/۰ باشد حجم پروتئین برای سنجش، کمتر انتخاب شود یا رقیق شود.

۴) حجم پروتئین برای سنجش در روش لوله آزمایش تا ۵۰ μ l و در روش میکروپلیت تا ۲۰ μ l می تواند باشد. در صورتیکه با مقادیر فوق جذب بیشتر از ۸/۰ شد، مقادیر کم شود.

در صورت بروز هرگونه ابهام، مشکل یا اشتباه با کارشناسان پشتیبانی فنی آرسام فرا زیست در میان بگذارید. کارشناسان ما با شماره تلفن ۰۹۱۴-۷۱-۵۷۴-۷۱ از طریق واتساپ، تلگرام و یا ایمیل ArsamFaraZist@gmail.com برای ارائه راهنمایی و رفع مشکل حاضر هستند.