KIAZIST Life Sciences

کیت اندازه گیری سمیت

سلولی توسط آنزیم لاکتات دهیدروژناز

LDH Assay Kit

KLDH96

اصول کار

مرگ سلولی هم به وسیله آپوپتوز و هم به وسیله نکروز رخ می دهد. نکروز با ورم میتوکندری و افزایش نفوذ پذیری غشا سلولی مشخص می شود، در حالیکه آپوپتوز با روند مشخص در ایجاد اجسام آپوپتوز متصل به غشا شناخته می شود. بدون در نظر گرفتن مکانیزم، تکنیک های زیادی برای بررسی سمیت سلولی (Cytotoxicity) وجود دارد. بیشتر آنها نفوذ پذیری غشا سلول را مورد سنجش قرار می دهد.

لاکتات دهیدروژناز (LDH) محلول در سیتوپلاسم سلولی می باشد. هنگام آسیب سلولی این آنزیم از غشا سلول عبور کرده و آزاد می شود که به نوبه خود فعالیت آن می تواند سمیت سلول را به طور مستقیم نشان دهد. این کیت به صورت همزمان از روش کالریمتریک طول موج (570 nm) و فلورومتریک (Ex/Em=540/592 nm) فعالیت این آنزیم را به صورت دقیق و حساسیت فوق العاده بالا پایش می نماید

نگهداری و حمل:

در C° 20- و در محل تاریک به مدت یک سال پایدار است

مقدار نمونه پیشنهادی

نمونه	حداکثر	مطلوب
Cells	5×10^6	5×10^5 –1×10^6

محتویات کیت

شماره	ماده	مقدار/تعداد
1	LDH Assay Buffer	10 mL
2	LDH Co-substrate	Lyophilized
3	PermiSolution	3 mL
4	Kit Booklet	1 PCs
5	96-well Clean photometric Plate	1 PCs
6	96-well Dark fluorometric Plate	در صورت درخواست

موارد مورد نیاز اضافی

ست سمپلر متغیر و چند کاناله

- سرسمپلر مناسب
- مواد پایه کشت سلول
- میکروتیوب ۱/۵میلی لیتری
- سانتریفیوژ برای پلیت کشت سلول (در صورت امکان)
- سانتریفیوژ دور بالا)۱۲۰۰۰ RPM(
- انکوباتور با دمای ۳۷ C°
- دستگاه Plate Readerبا طول موج ۵۷۰نانومتر و یا فلوریمتریک

Ex/Em=540/592 nm

نکته:

- قبل از انجام تست کل پروتکل را بخوانید.
- انجام پروتکل به صورت آزمایشی ( )Pilotحتما توصیه می شود

-پس از آماده سازی نمونه موارد زیر را آماده کنید.

-همه محلول ها در دمای اتاق گرم شوند.

- Working Buffer: ۱۰ میلی لیتر از LDH Assay Buffer را به بطری LDH Co-substrate اضافه کرده و به مدت ۱دقیقه به شدت تکان دهید. هر تست به میزان ۵۰ µL از این محلول نیاز دارید. هر تست به میزان ۵۰µL از این محلول نیاز دارید. مقداری را که مورد نیاز نیست تقسیم بندی کرده و در دمای ˚C 20- تا ۲ ماه برای دفعات بعدی نگهداری نمایید.

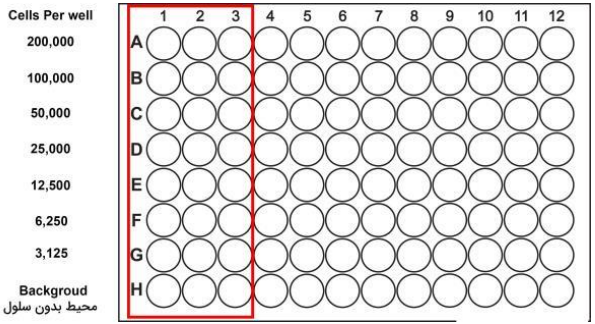
-نکته: توصیه می شود working Buffer پس از کاشت سلول آماده شود. به صفحات انجام آزمایش مراجعه کنید.

- PermiSolution: آماده مصرف می باشد

نحوه انجام آزمایش (تعیین تعداد سلول)

-ابتدا باید تعداد سلول های مورد نظر را بیابید چرا که فعالیت LDHدر سلول های مختلف متفاوت می باشد

- برای اینکار سلول ها را از تعداد ۳۱۲۵ تا ۲۰۰/۰۰۰ سلول در هر چاهک و به صورت سه تایی در یک پلیت کشت سلول، کشت دهید.



- چاهک های Backgroundحاوی محیط کشت با سرم جهت حذف تداخل LDHداخل سرم می باشد. حجم نهایی در هر چاهک باید 200 µL باشد.
- سپس به هر چاهک 20 µLاز PermiSolution اضافه کرده و به مدت یک ساعت در دمای اتاق انکوبه نمایید.
- سپس 150 µLاز هر چاهک سوپرناتانت برداشته و به تیوب تمیز جدیدی انتقال داده وبه مدت 5دقیقه در 400×gسانتریفیوژ کنید. (انتخابی
- 50 µL از سوپرناتانت حاصل را به پلیت 96خانه موجود در کیت انتقال داده و به هر چاهک 50 µLاز Working Buffer اضافه کنید

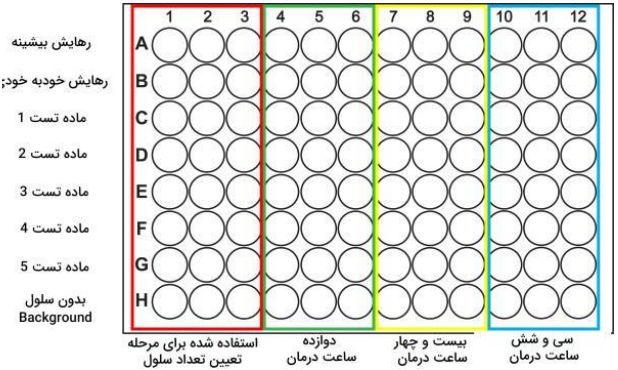
نحوه انجام آزمایش (تعیین تعداد سلول)

- در ادامه پلیت را در تاریکی و در دمای 37 °C به مدت ۳۰ دقیقه انکوبه نمایید.
- در ادامه جذب را بر اساس روش انتخابی به صورت زیر خوانش نمایید:
  - پلیت شفاف به روش کالریمتری: طول موج 520-560 nm
  - پلیت تیره به روش فلورومتری: Ex/Em= 540/590 nm
- از تمامی سه چاهک در هر ردیف میانگین بگیرید. سپس میانگین چاهک های Background را از سایر چاهک ها کم کنید. بدین ترتیب اثر لاکتات دهیدروژناز موجود در سرم محیط کشت حذف می شود.
- بهترین جذب در روش کالریمتری بین 0.2 تا 1 و در روش فلورومتری با RFU بین 10000-100000 می باشد.
- غلظت سلولی انتخاب شود که در بالاترین قسمت این طیف قرار می گیرد.

نکته: از غلظت سلولی محاسبه شده برای کاشت در مرحله سمیت سلولی (Cytotoxicity) و مشخص کردن اثر مواد مداخله بر آن استفاده شود.

نحوه انجام آزمایش (Cytotoxicity)

- **ابتدا در یک پلیت 96خانه استریل تعداد سلول مناسب که در مرحله قبل پیدا کردید حجم نهایی 200 uL در هر چاهک بریزید. از شکل زیر به عنوان نمونه کمک بگیرید. در چاهک های Background به میزان 220 uL محیط اضافه کنید.**

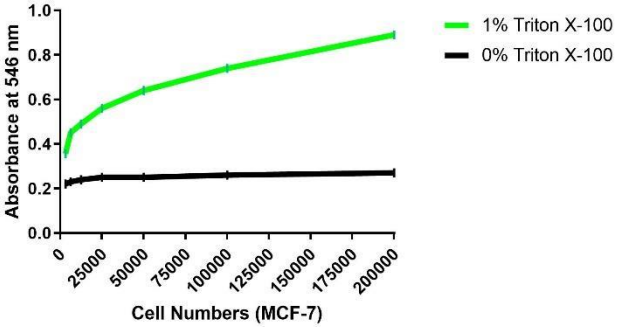


- **ماده مداخله را در حجم نهایی 20µLمحاسبه و به چاهک ها اضافه کنید.**
- **پس زمان مورد نظر و مداخله، در هر یک از چاهک های" رهایش بیشینه" 20µLازPermiSolutionاضافه کنید و در دمای اتاق یک ساعت انکوبه نمایید.**
- **سپس 150 µLاز هر چاهک سوپرناتانت برداشته و به تیوب تمیز جدیدی انتقال داده وبه مدت 5دقیقه در 400×gسانتریفیوژ کنید. (انتخابی)**
- **50 uL از سوپرناتانت حاصل را به پلیت 96خانه موجود در کیت انتقال داده و به هر چاهک 50µLازWorking Bufferاضافه کنید.**
- **در ادامه پلیت را در تاریکی و در دمای 37 ˚C به مدت 30دقیقه انکوبه نمایید.**

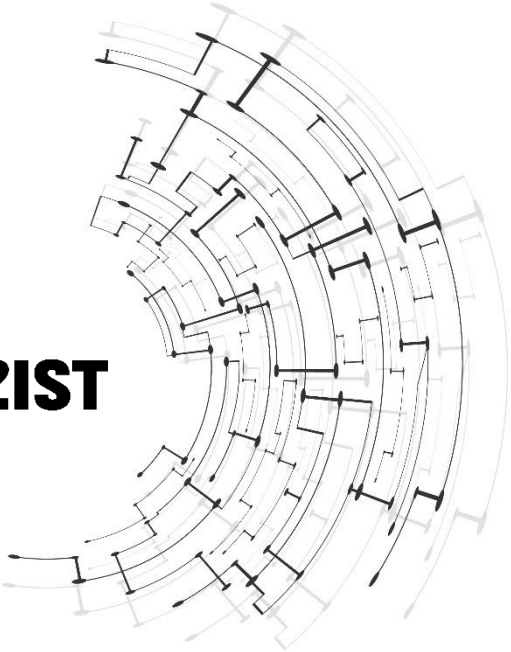
نحوه انجام آزمایش (Cytotoxicity)

- در ادامه جذب چاهک ها را بر حسب روش انتخابی بر طبق روش زیر اندازه گیری نمایید:
- در ادامه جذب را بر اساس روش انتخابی به صورت زیر خوانش نمایید:
  - پلیت شفاف به روش کالریمتری: طول موج 520-560 nm
  - پلیت تیره به روش فلورومتری: Ex/Em= 540/590 nm
- از تمامی سه چاهک در هر ردیف میانگین بگیرید. سپس میانگین چاهک های Background را از سایر چاهک ها کم کنید.
- سمیت سلولی را از فرمول زیر محاسبه نمایید:

$$\%\text{Cytotoxicity} = \frac{(\text{جذب ماده تست}) - (\text{جذب رهایش خود به خودی})}{(\text{جذب رهایش بیشینه}) - (\text{جذب رهایش خود به خودی})} \times 100$$


1% Triton X-100
0% Triton X-100
Absorbance at 546 nm
1.0
0.8
0.6
0.4
0.2
0.0
0
25000
50000
75000
100000
125000
150000
175000
200000
Cell Numbers (MCF-7)

KIAZIST



www.Kiazist.com

081-3450 8267
0930 402 4884

Info@Kiazist.com