KIAZIST Life Sciences

کیت اندازه گیری فعالیت لیزیل اکسیداز (LOX)

به روش کالریمتری و فلوریمتری

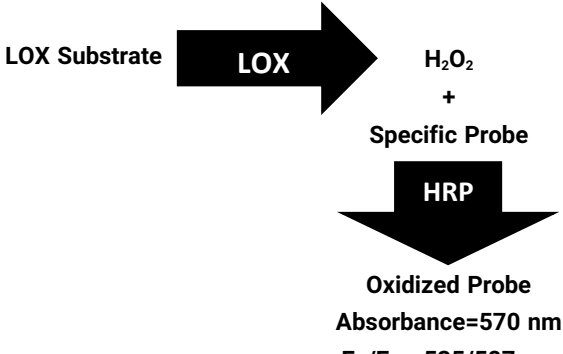
Lysyl Oxidase Activity Kit

اصول کار

آنزیم لیزیل اکسیداز (LOX) یکی از آنزیم های اصلی تنظیم کننده ساخت کلاژن و در نتیجه ماتریکس خارج سلولی می باشد. این آنزیم توسط هایپوکسی القا می شود و به عنوان یکی از مارکرهای اصلی متاستاز سلول های سرطانی شناخته می شود.

در این کیت آنزیم توسط سوبسترای ویژه خود فعالیت می کند و سپس با اکسید کردن پروب ویژه به هر دو روش کالریمتری و فلوریمتری فعالیت آن ثبت می شود.

اصول واکنش:



اطلاعات کلی و محتویات

نگهداری و حمل:

در دمای C° 20- نگهداری شود. حمل توسط یخ مرطوب انجام می شود.

مقدار نمونه پیشنهادی

نمونه	حداکثر	مطلوب
Tissue	30 mg	20 mg
Cells	1.5×10^{6}	5×10^{5} –1×10^{6}
Serum	20 µl	10 µl

محتویات کیت

شماره	ماده	مقدار/تعداد
۱	LOX Substrate Buffer	5 mL
۲	LOX Probe	20 µL
۳	HRP	100 µL
۴	LOX Lysis Buffer	50 mL
۵	96-well Clean photometric Plate 96-well Dark Fluorometric Plate	1 PCs در صورت درخواست
۶	Protocol Booklet	1 PCs

موارد مورد نیاز اضافی

- ست سمپلر متغیر و چند کاناله
- سرسمپلر مناسب
- میکروتیوب ۱/۵ میلی لیتری
- سانتریفیوژ دور بالا (12000 RPM)
- دستگاه Plate Reader با طول موج 570-520 نانومتر یا دستگاه فلورسانس با مشخصات Ex/Em=537/586
- مهار کننده پروتئازها (پیشنهادی کیازیست KPI100)
- پلیت تیره مخصوص فلوریمتری (همراه با کیت درخواست شود)

نکته: قبل از شروع، آزمایش با یک نمونه جهت مشخص ساختن مقدار نمونه به صورت پایلت (Pilot) به همراه یک استاندارد انجام شود.

***قبل از انجام تست کل پروتکل را بخوانید.**

آماده سازی نمونه

هموژن کردن بافت

نمونه بافت: ۱۰ تا ۲۰ میلی گرم از بافت را توسط سونیکاتور و یا هموژنایزر در بافر LOX Lysis Buffer (یا بافر جایگزین) که حاوی کوکتل مهارکننده پروتئاز می باشد لیز کرده و سپس در 12000 rpm به مدت ۱۵ دقیقه در 4 °C سانتریفیوژ کنید . سوپرناتانت را در تیوب جدید در دمای 80-°C فریز کنید.

سلول های چسبنده

محیط را خالی و سپس سلول ها را تریپسینه کرده و پس از سانتریفیوژ کردن سوپرناتانت را دور ریخته و در بافر LOX Lysis Buffer (یا بافر جایگزین) که حاوی کوکتل مهارکننده پروتئاز می باشد تا ۳ بار فریز و دفریز نمایید تا سلول ها لیز شوند. سپس در 12000 rpm به مدت ۱۵ دقیقه در 4 °C سانتریفیوژ کنید . سوپرناتانت را در تیوب جدید در دمای 80-°C فریز کنید.

سلول های معلق

پس از سانتریفیوژ کردن سوپرناتانت را دور ریخته و در بافر LOX Lysis Buffer (یا بافر جایگزین) که حاوی کوکتل مهارکننده پروتئاز می باشد تا ۳ بار فریز و دفریز کرده تا سلول ها لیز شوند. سپس در 12000 rpm به مدت ۱۵ دقیقه در 4 °C سانتریفیوژ کنید . سوپرناتانت را در تیوب جدید در دمای 80-°C فریز کنید.

نمونه پلاسما

خون را در تیوب حاوی ضد انعقاد ریخته و به مدت ۱۰ دقیقه در 1000×g سانتریفیوژ کنید . پلاسمای زرد رنگ را بدون آسپیره کردن لایه سفید بافی (لکوسیت) برداشته و تا زمان آزمایش در دمای 80-°C فریز کنید.

نمونه سرم

خون را در تیوب حاوی بدون انعقاد ریخته و به مدت ۳۰ دقیقه در دمای اتاق انکوبه کرده و سپس در 1000×g سانتریفیوژ کنید . سرم زرد رنگ را بدون آسپیره کردن لایه سفید بافی (لکوسیت) برداشته و تا زمان آزمایش در دمای 80-°C فریز کنید.

آماده سازی کیت

- **پس از آماده سازی نمونه موارد زیر را آماده کنید.**
- **همه محلول ها در دمای اتاق گرم شوند.**
- **تمام میکروتیوب ها اسپین شوند تا مواد از در و دیواره ها به ته ظرف جمع آوری شود.**
- **تمامی موارد آماده به مصرف می باشند.**

نحوه انجام آزمایش

۱. برای انجام آزمایش به ازای هر پنج نمونه طبق جدول زیر مسترمیکس آماده شود:

نام ماده	مقدار (µL)
LOX Substrate Buffer	250
HRP	5
LOX Probe	1

۲. سپس به هر چاهک µL 50 از نمونه اضافه شود. توصیه می شود بنا به دلایل آماری نمونه ها حداقل به صورت دوتایی (Duplicate) انجام پذیرد.

۳. به چاهک های بلانک µL 50 از LOX Lysis Buffer اضافه شود.

۴. سپس در صورتیکه دستگاه Plate Reader از دمای °C 37 پشتیبانی می کند آن را آماده سازید.

۵. برای جذب کالریمتری طول موج nm 570 و برای فلوریمتری به صورت Excitation/Emission=537/585 nm تنظیم شود.

۶. جذب به صورت کینتیک به مدت کلی ۵۰ دقیقه و هر ۱۰ دقیقه یک خوانش انجام پذیرد.

نکته: برای روش فلوریمتری Gain باید طوری تنظیم شود که خوانش اولیه زیر RUF 50000 باشد.

نحوه محاسبه

۱. ابتدا از چاهک های دوتایی میانگین بگیرید.

۲. میانگین جذب چاهک های بلانک را از نمونه ها کم کنید.

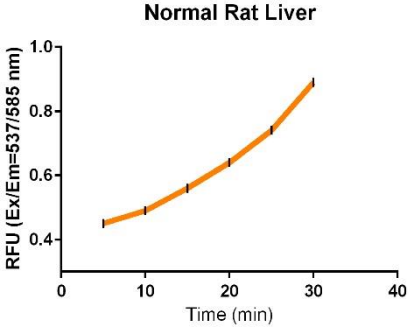
۳. سپس از فرمول زیر Δ570 را محاسبه نمایید:

$$\Delta 570 = \frac{A2-A1}{T2-T1}$$

- جذب اول: A1
- جذب دوم: A2
- زمان جذب اول: T1
- زمان جذب دوم: T2

- سپس با تقسیم Δ570 گروه های درمانی بر Δ570 گروه کنترل میزان تغییر (Fold Change) را نسبت به گروه کنترل بیان نمود.
- جهت نرمال سازی مقادیر بهتر است میزان پروتئین یا DNA نمونه ها سنجیده شود و مقادیر برحسب میلی گرم پروتئین نرمال سازی شوند.

نمونه تست


Normal Rat Liver
RFU (Ex/Em=537/585 nm)
1.0
0.8
0.6
0.4
0
10
20
30
40
Time (min)

مشکل یابی

مشکل	علت	راه حل
عدم وجود سیگنال	-مقدار نمونه اولیه کم	-مقدار نمونه اولیه را زیاد کم کنید
	-استفاده از روش کالریمتری	-از روش فلوریمتری به صورت ترجیحی استفاده کنید
	-تخریب نمونه	-نمونه ها تازه باشند و از مهارکننده پروتئاز استفاده شود
کدورت چاهک	-نمونه های با چربی بالا -نمونه با RBC لیز شده -نمونه با بیلی روبین بالا	-نمونه ها را رقیق کنید تا اثر مداخله گر ها از بین برود

KIAZIST

www.Kiazist.com

081-3450 8267
0930 402 4884

Info@Kiazist.com