KIAZIST Life Sciences

کیت اندازه گیری فعالیت آنزیم

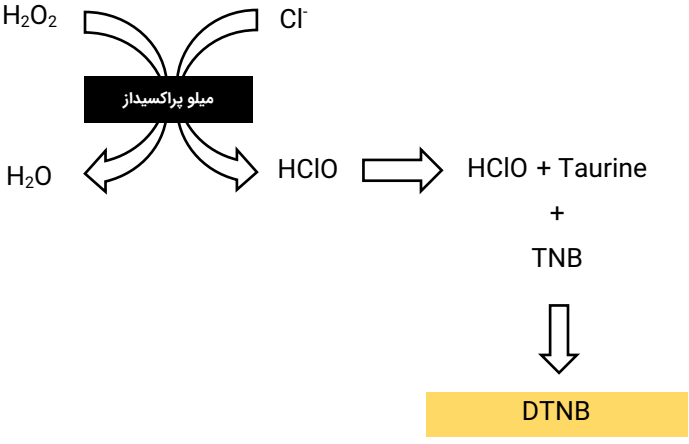
میلو پراکسیداز (کالریمتری)

MPO Activity Kit

KMPO96

آنزیم میلو پراکسیداز (Myeloperoxidase) به طور عمده در نوتروفیل ها وجود دارد و مسئول خاصیت ضد میکروبی آنها در ایمنی ذاتی می باشد. این آنزیم حاوی گروه هم (Heme) که جایگاه اصلی آن در لیزوزوم هاست می باشد و با تولید ماده به شدت واکنش گر هایپوکلر (HClO)، باکتری ها و سایر پاتوژن ها را از بین می برد. در این کیت فعالیت آنزیم پس آماده سازی در طول موج 405 nm به صورت کاهشی قابل اندازه گیری می باشد.

اصول واکنش:



نگهداری و حمل:
در دمای 4˚C نگهداری شود. حمل توسط یخ مرطوب انجام می شود.
حساسیت: 0.5 mU/well

مقدار نمونه پیشنهادی

نمونه	حداکثر	مطلوب
Tissue	30 mg	20 mg
Cells	2×10^6	5×10^5 –3×10^6
Serum	40 µl	20 µl

محتویات کیت

شماره	ماده	مقدار/تعداد
1	MPO Buffer 10X	**5 mL**
2	MPO Substrate	**50 µL**
3	MPO DTNB	**Powder**
4	DTNB Solubilizer	**250 µL**
5	DTT	**120 µL**
6	Stop Reagent	**150 µL**
7	96-well Clean photometric Plate	**2 PCs**

موارد اضافی مورد نیاز

- ست سمپلر متغیر و چند کاناله
- سرسمپلر مناسب
- میکروتیوب ۱/۵ میلی لیتری
- سانتریفیوژ دور بالا (12000 RPM)
- دستگاه Plate Reader با طول موج 420-400 نانومتر
- پیشنهادی: بافر استخراج آنزیم کیازیست (KEXT50). در صورت استفاده از بافر موجود در کیت حتما بافت توسط نیتروژن مایع و یا هموژنایزر، هموژن شود.
- پیشنهادی: مهار کننده پروتئازها (پیشنهادی کیازیست KPI100)

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.
- انجام آزمایش به صورت پایلت (Pilot) حتما توصیه می شود.

هموژن کردن بافت

نمونه بافت: ۱۰ تا ۲۰ میلی گرم از بافت را توسط سونیکاتور و یا هموژنایزر در بافر **MPO Buffer 1X** (یا بافر جایگزین) که حاوی کوکتل مهارکننده پروتئاز می باشد لیز کرده و سپس در **12000 rpm** به مدت ۱۵ دقیقه در ۴ درجه 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 **MPO Buffer 1X** (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 ۴ درجه 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 **MPO Buffer 1X** (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 ۴ درجه سانتریفیوژ کنید . سوپرناتانت را در تیوب جدید در دمای **-80˚C** فریز کنید.

نمونه پلاسما یا سرم

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 های سرم یا پلاسما به صورت **1:5** با MPO Buffer 1x رقیق شوند.

آماده سازی کیت

پس از آماده سازی نمونه موارد زیر را آماده کنید. همه محلول ها در دمای اتاق گرم شوند.

MPO Buffer 1X : ۲ میلی لیتر از MPO Buffer 10X را با ۱۸ میلی لیتر آب دیونیزه مخلوط کنید تا MPO Buffer 1X حاصل شود.

محلول کاری سوبسترا: برای ۹۶ تست ۱۰ میکرولیتر از MPO Substrate را با ۹۹۰ میکرولیتر آب دیونیزه ترکیب کنید.

محلول کاری Stop Reagent: در پایان مرحله ۴ "**انجام آزمایش**" آماده شود. به ویال Stop Reagent ۸۵۰ میکرولیتر PBS اضافه کرده سپس تقسیم بندی نموده و در دمای ۲۰- °C تا ۲ ماه نگهداری نمایید. هر نمونه به ۱۰ میکرولیتر از این محلول نیاز دارد.

MPO DTNB: 200 µL از DTNB Solubilizer را به آن اضافه کرده و حل نمایید. به مدت حداقل یک ماه در ۲۰- ˚C پایدار می باشد.

استانداردها: در چاهک ها مستقیما فقط MPO Buffer 1X اضافه شود.

کد	Reaction mix 2 (µL)	MPO Buffer 1X (µL)	غلظت استاندارد (nM/mL)
A	به مرحله ۵ از انجام آزمایش مراجعه شود	۱۳۰	۰
B		۱۲۴	۱۰
C		۱۱۸	۲۰
D		۱۱۲	۳۰
E		۱۰۶	۴۰
F		۱۰۰	۵۰

۱. در ادامه به هر چاهک نمونه و یا کنترل نمونه ۴۰ میکرولیتر از نمونه اضافه می کنیم .

۲. سپس Reagent mix 1 را بر طبق جدول زیر آماده کنید:

اجزا	مخلوط برای هر نمونه (µL)	مخلوط برای هر کنترل نمونه (µL)
MPO Buffer 1X	۴۰	۴۰
محلول کاری سوبسترا	۱۰	۰
آب دیونیزه	۰	۱۰

- به چاهک های استاندارد از این مخلوط اضافه **نکنید**!!
- دقت داشته باشید چاهک کنترل نمونه به موازات هر نمونه متغیر می باشد و انجام آن اختیاری می باشد.
- سعی کنید برای کل نمونه ها به صورت مسترمیکس آماده کنید و به هر چاهک ۵۰ میکرولیتر اضافه نمایید.
- سپس در دمای اتاق به مدت ۳۰ تا ۱۲۰ دقیقه (بسته به نوع نمونه) انکوبه کنید. این زمان را تحت عنوان T یادداشت کنید.
- در این زمان ۱۰ میکرولیتر از محلول کاری Stop reagent که هم اکنون آماده کرده اید به همه چاهک ها به جز استانداردها اضافه کرده و در دمای اتاق ۱۰ دقیقه انکوبه کنید.

۳. ابتدا Reaction mix 2 را بر طبق جدول زیر به ازای هر نمونه آماده کنید . به ازای هر نمونه دو چاهک). (پایداری ۲ ساعت روی یخ)

ماده	مقدار (µL)
MPO Buffer 1X	۴۹
MPO DTNB	۰/۵
DTT	۰/۵

* می توانید به ازای تمام نمونه ها، کنترل آنها و استانداردها مسترمیکس آماده کنید.

۴. سپس به استثنای چاهک های استاندارد به هر چاهک ۳۰ میکرولیتر از Reaction mix 2 اضافه کرده و در دمای اتاق به مدت ۵ تا ۱۰ دقیقه انکوبه کنید.

۵. پس از این زمان از Reaction mix 2 به بر طبق جدول زیر به هر چاهک استاندارد اضافه کنید.

کد	Reaction mix 2 (µL)	غلظت استاندارد (nM/mL)
A	۰	۰
B	۶	۱۰
C	۱۲	۲۰
D	۱۸	۳۰
E	۲۴	۴۰
F	۳۰	۵۰

۶. در پایان جذب را در 405 nm بخوانید.

-نمونه ها باید در محدوده جذب منحنی استاندارد قرار بگیرند.

-بنا به دلایل آماری هر نمونه باید حداقل به صورت دوتایی (Duplicate) انجام شود.

-از چاهک ها میانگین گرفته و میزان جذب میانگین A را از تمامی نمونه ها و استاندارد ها کم کنید.

-اگر از کنترل نمونه استفاده کرده اید، میانگین جذب کنترل هر نمونه را از میانگین جذب نمونه ها کم کنید.

-توسط نرم افزار Excel و یا Curve Expert Basic منحنی استاندارد را رسم کرده و غلظت هر نمونه را از روی منحنی و معادله آن محاسبه کنید.

-سپس از فرمول زیر اقدام نمایید:

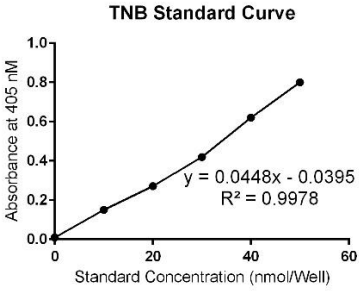
$$\text{MPO Activity (nmol/min/well or mU/well)} = \frac{B}{T} \times D \times \frac{130}{40}$$

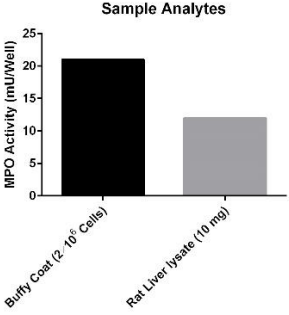
B= عدد به دست آمده از منحنی استاندارد

T=زمان سپری شده در مرحله ۴ انجام آزمایش

D= ضریب رقت نمونه

- می توان میزان پروتئین هر نمونه را اندازه گیری کرد و مقادیر به دست آمده از هر نمونه را بر اساس آن نرمال سازی کرد که در این صورت واحد به صورت mU/mg of protein گزارش می شود.

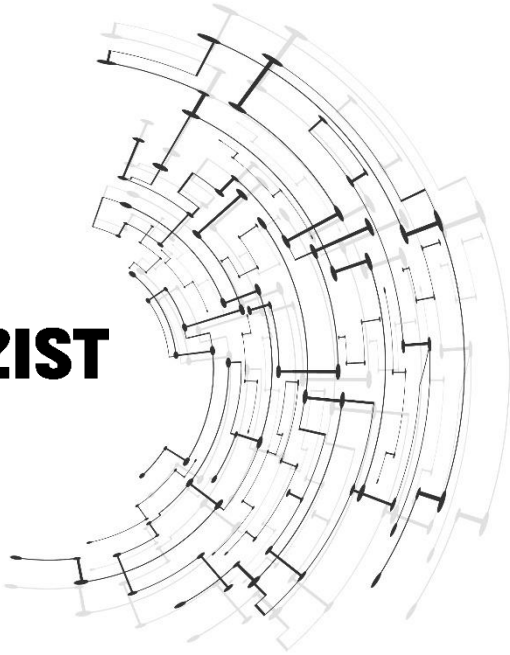

TNB Standard Curve
Absorbance at 405 nM
1.0
0.8
0.6
0.4
0.2
0.0
y = 0.0448x - 0.0395
R² = 0.9978
0
20
40
60
Standard Concentration (nmol/Well)


Sample Analytes
MPO Activity (mU/Well)
25
20
15
10
5
0
Buffy Coat (2·10⁶ Cells)
Rat Liver lysate (10 mg)

مشکل یابی

مشکل	علت	راه حل
عدم کارکرد تست	سرد بودن بافرها و مواد	همه مواد را به دمای اتاق برسانید
	طول موج اشتباهی	سعی کنید طول موج 405 nm را انتخاب کنید
نمونه با خوانش غیر عادی	عدم هموژن شدن کامل نمونه	از هموژنازیر یا سونیکاتور استفاده کنید
	نمونه چند بار فریز-دفریز شده است	اگر نیاز به چندین بار استفاده از نمونه دارید قبل از فریز کردن آن را تقسیم بندی کنید.
	نمونه های کهنه استفاده شده است	نمونه های با ذخیره بلند مدت حتما در نیتروژن ذخیره شوند
	وجود عوامل مداخله گر مانند چربی و یا بافر استخراج نامناسب	عوامل مداخله گر حذف شوند و بافر مناسب استخراج استفاده شود
جذب خیلی پایین نمونه	مقدار آنزیم بالاست	نمونه را در MPO Buffer 1X رقیق کنید
جذب خیلی بالای نمونه	نمونه با فعالیت بسیار پایین آنزیم	مقدار نمونه اولیه را افزایش داده و از بافر استخراج مناسب استفاده کنید

KIAZIST



www.Kiazist.com

081-3450 8267
0930 402 4884

Info@Kiazist.com