

کیت اندازه گیری سمیت
سلولی توسط آنزیم لاکتات دهیدروژناز

LDH Assay Kit

KLDH96

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

اطلاعات کلی و محتویات

نگهداری و حمل:

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

مقدار نمونه پیشنهادی

مطلوب	حداکثر	نمونه
$5 \times 10^5 - 1 \times 10^6$	5×10^6	Cells

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 <u>Clean</u> photometric Plate	1 PCs
6	96-well <u>Dark</u> fluorometric Plate	در صورت درخواست

ست سمپلر متغیر و چند کاناله

• سرسمپلر مناسب

• مواد پایه کشت سلول

• میکروتیوب ۱/۵ میلی لیتری

• سانتریفیوژ برای پلیت کشت سلول (در صورت امکان)

• سانتریفیوژ دور بالا (۱۲۰۰۰ RPM)

• انکوباتور با دمای ۳۷ °C

• دستگاه Plate Reader با طول موج ۵۷۰ نانومتر و یا فلوریمتریک

Ex/Em=540/592 nm

نکته:

• قبل از انجام تست کل پروتکل را بخوانید.

• انجام پروتکل به صورت آزمایشی (Pilot) حتما توصیه می شود

آماده سازی کیت

-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 ۱ دقیقه به شدت تکان دهید. هر تست به میزان ۵۰ μ L از این

محلول نیاز دارید. هر تست به میزان ۵۰ μ L از این محلول نیاز دارید. مقداری را که مورد

نیاز نیست تقسیم بندی کرده و در دما 20°C - تا ۲ ماه برای دفعات بعدی نگهداری نمایید.

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

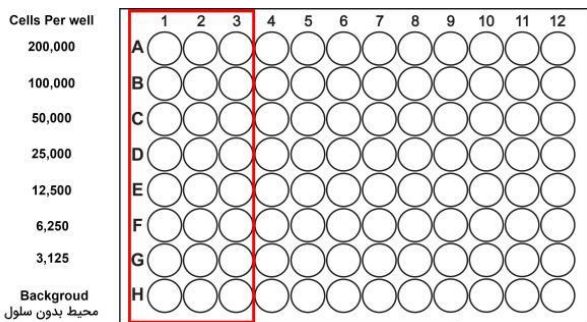
انجام آزمایش مراجعه کنید.

- PermiSolution: آماده مصرف می باشد

نحوه انجام آزمایش (تعیین تعداد سلول)

-ابتدا باید تعداد سلول های مورد نظر را بیابید چرا که فعالیت LDH در 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 **Background** حاوی محیط کشت با سرم جهت حذف تداخل LDH داخل سرم می باشد. حجم نهایی در هر چاهک باید **200 μ L** باشد.
- سپس به هر چاهک **20 μ L** از **PermiSolution** اضافه کرده و به مدت یک ساعت در دمای اتاق انکوبه نمایید.
- سپس **150 μ L** از هر چاهک سوپرناتانت برداشته و به تیوب تمیز جدیدی انتقال داده و به مدت 5 دقیقه در **400xg** سانتریفیوژ کنید. (انتخابی)
- **50 μ L** از سوپرناتانت حاصل را به پلیت 96 خانه موجود در کیت انتقال داده و به هر چاهک **50 μ L** از **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: $\text{Ex/Em} = 540/590 \text{ nm}$
- 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 96 خانه استریل تعداد سلول مناسب که در مرحله قبل پیدا کردید حجم نهایی 200 μL در هر چاهک بریزید. از شکل زیر به عنوان نمونه کمک بگیرید. در چاهک های Background به میزان 220 μL محیط اضافه کنید.

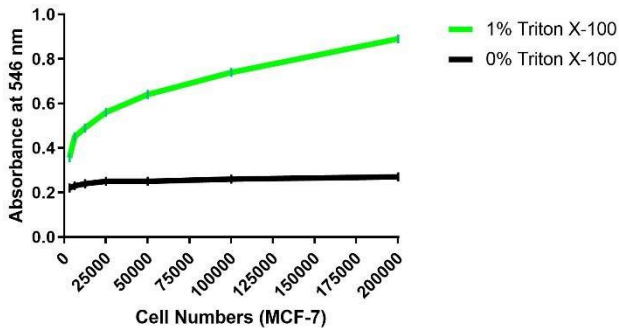
	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12
رهایش بیشینه	A											
رهایش خودبه خود:	B											
ماده تست 1	C											
ماده تست 2	D											
ماده تست 3	E											
ماده تست 4	F											
ماده تست 5	G											
بدون سلول Background	H											
	استفاده شده برای مرحله تعیین تعداد سلول			دوزده ساعت درمان			بیست و چهار ساعت درمان			سی و شش ساعت درمان		

- ماده مداخله را در حجم نهایی 20 μL محاسبه و به چاهک ها اضافه کنید.
- پس زمان مورد نظر و مداخله، در هر یک از چاهک های "رهایش بیشینه" 20 μL از PermiSolution اضافه کنید و در دمای اتاق یک ساعت انکوبه نمایید.
- سپس 150 μL از هر چاهک سوپرناتانت برداشته و به تیوب تمیز جدیدی انتقال داده و به مدت 5 دقیقه در 400 $\times$ g سانتریفیوژ کنید. (انتخابی)
- 50 μL از سوپرناتانت حاصل را به پلیت 96 خانه موجود در کیت انتقال داده و به هر چاهک 50 μL Working Buffer اضافه کنید.
- در ادامه پلیت را در تاریکی و در دمای 37 $^{\circ}\text{C}$ به مدت 30 دقیقه 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:

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



KIAZIST



www.Kiazist.com



081-3450 8267

0930 402 4884



Info@Kiazist.com