

环氧化酶-2(COX-2)抑制剂筛选试剂盒

产品编号	产品名称	包装
S0168	环氧化酶-2(COX-2)抑制剂筛选试剂盒	100次

产品简介:

- 碧云天研发的环氧化酶-2(COX-2)抑制剂筛选试剂盒(Cyclooxygenase 2 Inhibitor Screening Kit, 也称COX-2 Inhibitor Screening Kit)是一种利用荧光检测, 简单、快速、灵敏地用于人COX-2抑制剂高通量筛选的试剂盒。
- 环氧化酶(cyclooxygenase, COX)又称前列腺素内氧化酶合成酶(Prostaglandin-endoperoxide synthase, PTGS), 是一种同时具有环氧化酶和过氧化氢酶活性的双功能酶。例如, COX的环氧化酶活性可以催化花生四烯酸(Arachidonic Acid, AA)转化为前列腺素G2(prostaglandin G2, PGG2), 而COX的过氧化氢酶活性又可以可将前列腺素G2转化为前列腺素H2(prostaglandin H2, PGH2) [1,2]。
- 有两种常见的COX, 一种是组成性表达的COX-1 (COX1), 另一种是诱导性表达的COX-2 (COX2)。哺乳动物的COX-1与COX-2的分子量相似, 分别是70和72KDa, 其氨基酸序列有65%同源, 其中酶催化活性区域的氨基酸序列几乎一致。COX-1在很多组织中组成性表达, 在胃粘膜、肾脏等中高表达, 催化产生维持正常生理功能的前列腺素, 从而参与血管舒缩、血小板聚集、胃粘膜血流、胃黏液分泌及肾脏功能等的调节。COX-2在正常生理状态下几乎不表达或表达很少, 仅在脑、肾脏和生殖器官等中有一定水平的组成性表达。COX-2在巨噬细胞、成纤维细胞、内皮细胞和单核细胞等发生炎症反应时, 可以被诱导表达。例如受炎性刺激物、损伤、有丝分裂原或致癌物质等促炎介质诱导后, COX-2的表达增高, 从而参与多种病理生理过程。COX-3是COX-1的不同剪接体, 和COX-1相比, COX-3多保留了一个内含子, 在狗(dog)中该内含子的长度为93个碱基, 而在人和小鼠中长度为94个碱基, 因此在狗中COX-3是有酶活性的, 而人和小鼠中的COX-3由于移码突变而没有酶活性[3]。
- COX-2与炎症和肿瘤等的发生发展密切相关。因此, COX-2的选择性抑制剂成为药物研究的一个热点。1991年1月第一个真正意义上的COX-2选择性抑制剂塞来昔布(Celecoxib)经美国FDA批准上市, 同年5月第二个选择性抑制剂罗非昔布(Rofecoxib)也在欧洲上市。这些COX-2抑制剂药物成功上市, 为后续COX-2选择性抑制剂的研究和发展开辟了广阔道路。如今在临床上COX-2选择性抑制剂已经被广泛用于治疗类风湿性关节炎、骨关节炎、牙痛、手术后疼痛以及肿瘤等疾病。
- 本试剂盒的检测的基本原理参考图1。在辅助因子(Cofactor)存在的情况下, COX-2使用其环氧化酶(COX)活性把花生四烯酸(Arachidonic Acid)等底物环氧化生成PGG2等中间产物, 继而COX-2使用其过氧化物酶(peroxidase)活性把PGG2等中间产物催化生成PGH2等最终产物, 同时把几乎没有荧光的COX-2探针(Probe)催化生成有强荧光的探针(Ex560/Em590)。这样通过荧光检测就可以非常灵敏地检测COX-2的酶活性。如果在反应中加入COX-2抑制剂(Inhibitor), 荧光的生成就会被抑制, 荧光强度与抑制剂的抑制效果成反比, 这样就可以检测出抑制剂的抑制效果。本反应生成的强荧光探针的最大激发波长为571nm, 最大发射波长为585nm, 推荐检测时的激发波长为560nm, 发射波长为590nm。

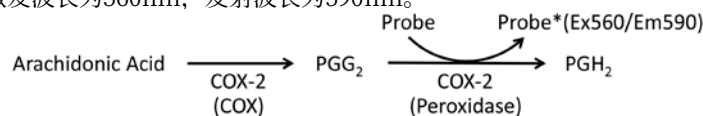


图1. 碧云天环氧化酶-2 (COX-2)抑制剂筛选试剂盒(S0168)筛选COX-2抑制剂的原理图。Probe*表示催化生成的强荧光探针。

- 本试剂盒中提供了人重组COX-2 (recombinant human COX-2, rhCOX-2)、底物(Substrate)、辅助因子(Cofactor)、阳性对照COX-2抑制剂(Celecoxib)及可以被COX-2催化产生荧光的荧光探针(Probe), 并且对COX-2和底物的使用量进行了优化。
- 本试剂盒灵敏性好, 且特异性强。本试剂盒不仅能检测出IC50很低的抑制剂, 也能检测出IC50较高的抑制剂, 而且特异性强, 如图2所示, 对COX-2特异性抑制剂Celecoxib的IC50约为30nM, 而对COX-1特异性抑制剂SC-560的IC50达到2μM。碧云天同时提供环氧化酶-1(COX-1)抑制剂筛选试剂盒(S0165)。

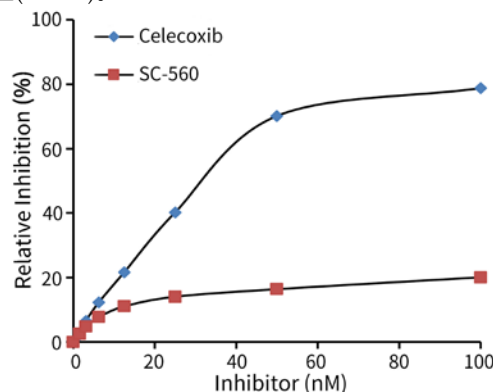


图2. 碧云天环氧化酶-2(COX-2)抑制剂筛选试剂盒(S0168)的抑制效果图。Celecoxib为COX-2的特异性抑制剂, SC-560为COX-1的特异性抑制剂。使用本试剂盒进行检测, 对于COX-2, Celecoxib的IC50约为30nM, SC-560的IC50约为2 μ M。实测结果可能会因样品和检测条件等的不同而存在差异, 图中数据仅作参考。

➤ 用于96孔板检测时, 一个小包装的本试剂盒可以进行100次检测。

包装清单:

产品编号	产品名称	包装
S0168-1	COX-2 Assay Buffer	30ml
S0168-2	COX-2 Probe	600 μ l
S0168-3	COX-2 Cofactor (50X)	20 μ l
S0168-4	COX-2 Substrate (50X)	20 μ l
S0168-5	Substrate Buffer	100 μ l
S0168-6	rhCOX-2 (25X)	22 μ l
S0168-7	Celecoxib (100 μ M)	20 μ l
—	说明书	1份

保存条件:

-20 $^{\circ}$ C保存, 半年有效。其中COX-2 Probe和COX-2 Cofactor (50X)须避光保存。

注意事项:

- COX-2 Probe在空气中不太稳定, 开启后应尽快使用, 且在使用过程中要注意适当避光。
- COX-2 Probe的反应产物在还原剂的存在下会很不稳定, 样品中带入到最终反应体系中的二硫苏糖醇(DTT)或者 β -巯基乙醇的浓度须低于10 μ M。
- 请确保样品的pH值在7-8之间, 或者确保加入样品后反应体系的pH值在7-8之间, 否则会影响COX-2 Probe的稳定性和荧光值。
- COX-2 Probe和COX-2 Assay Buffer需要完全解冻并回复至室温后再使用, 否则会影响检测结果。rhCOX-2 (25X)使用时应在冰上进行。使用完毕后各试剂应立即按照试剂盒要求的条件保存。
- COX-2 Substrate (50X)容易被氧化, 请尽量避免长时间与空气接触。且在使用和储存过程中请注意保持低温, 否则其稳定性可能会受到影响。
- 待测抑制剂的溶剂可能会对检测产生干扰, 如无水乙醇和70%乙醇。推荐以COX-2 Assay Buffer、Milli-Q级纯水、DMSO为溶剂配制、稀释待测抑制剂, 并在对照孔中添加与抑制剂等体积的溶剂以排除干扰。
- COX-2 Cofactor (50X)、COX-2 Substrate (50X)、rhCOX-2 (25X)等试剂的量均比较少, 在使用前请先适当离心, 然后适当混匀后再使用。
- Substrate Buffer有腐蚀性, 操作时请小心, 并注意有效防护以避免直接接触人体或腐蚀其他物品; Celecoxib对人体有害, 操作时请小心, 并注意有效防护以避免直接接触人体或吸入体内。
- 本产品仅限于专业人员的科学研究用, 不得用于临床诊断或治疗, 不得用于食品或药品, 不得存放于普通住宅内。
- 为了您的安全和健康, 请穿实验服并戴一次性手套操作。

使用说明:

1. 样品的准备:

取适量待测定的抑制剂, 用COX-2 Assay Buffer、Milli-Q级纯水、DMSO等适当的溶剂配制成适宜浓度的溶液, 如果有必要可以配制成适当的浓度梯度待用。超纯水推荐使用碧云天的BeyoPure™ Ultrapure Water (Sterile) (ST872/ST876)。

注: 抑制剂的稀释和配制使用同一种溶剂通常会比较方便一些。

2. 试剂盒的准备:

- 融解除COX-2 Substrate (50X)和rhCOX-2 (25X)以外的其它所有试剂至室温, 略离心使溶液沉淀至管底, 再混匀备用。COX-2 Probe、COX-2 Cofactor (50X)和Celecoxib (100 μ M)配制在DMSO中, 可37 $^{\circ}$ C水浴0.5-2min促进融解。使用完毕后宜立即-20 $^{\circ}$ C避光保存。
- COX-2 Cofactor工作液的配制: 按照每个样品需要5微升COX-2 Cofactor工作液的比例配制适量的COX-2 Cofactor工作液。取适量的COX-2 Cofactor (50X), 按照1:49的比例用COX-2 Assay Buffer稀释。例如4微升COX-2 Cofactor (50X)加入196微升COX-2 Assay Buffer配制成200微升COX-2 Cofactor工作液。配制好的COX-2 Cofactor工作液可4 $^{\circ}$ C存放, 仅限当日使用。
- COX-2工作液的配制: 按照每个样品需5微升COX-2工作液的比例配制适量的COX-2工作液。取适量的rhCOX-2 (25X), 按照1:24的比例用COX-2 Assay Buffer稀释。例如8微升rhCOX-2 (25X)加入192微升COX-2 Assay Buffer配制成200微升COX-2工作液。配制好的COX-2工作液可在冰浴上暂时保存, 1小时内酶活性基本稳定。注: 所有涉及COX-2的操作应在冰上进行。
- COX-2 Substrate工作液的配制: 按照每个样品需5微升COX-2 Substrate工作液的比例配制适量的COX-2 Substrate工作液。取适量的COX-2 Substrate (50X), 加入等体积的Substrate Buffer, 充分涡旋混匀, 该混合物再按照1:24的比例用Milli-Q级纯水或重蒸水稀释, 充分涡旋混匀。例如20微升COX-2 Substrate (50X)加入20微升Substrate Buffer, 涡旋混匀后, 再加入960微升Milli-Q级纯水或重蒸水, 再充分涡旋混匀, 最终获得1毫升COX-2 Substrate工作液。配制好的COX-2 Substrate工作液可在冰浴上暂时保存, 1小时内较为稳定。

注：COX-2 Substrate工作液也可在样品检测时37°C孵育10分钟的过程中配制。

- e. 阳性抑制剂Celecoxib溶液的配制：本试剂盒提供的阳性对照抑制剂Celecoxib浓度为100μM，配制在DMSO中，可以根据需要使用与待测抑制剂一样的溶剂稀释成所需浓度或浓度梯度。通常Celecoxib的IC50约为10nM-100nM，使用本试剂盒时Celecoxib的抑制效果参考图2。

3. 样品检测：

- a. 参考下表，使用96孔黑板设置对照孔和样品孔，并按照下表依次加入样品和各溶液。加入待测样品后，混匀，37°C孵育10分钟。注：加入待测样品后的孵育也可以在25°C或室温进行。大多数的抑制剂对COX-2活性抑制具有时间依赖性，改变与抑制剂的作用时间可以显著改变化合物的IC50值，建议通过测试确定未知抑制剂比较适合的孵育时间。为获得更加可靠的检测结果，建议每个样品至少应该进行2个重复孔的检测。

	空白对照	100%酶活性对照	阳性抑制剂对照	样品(Sample)
COX-2 Assay Buffer	80μl	75μl	75μl	75μl
COX-2 Cofactor工作液	5μl	5μl	5μl	5μl
COX-2工作液	-	5μl	5μl	5μl
样品溶剂*	5μl	5μl	-	-
Celecoxib溶液	-	-	5μl	-
待测样品	-	-	-	5μl

37°C孵育10分钟

注：*样品溶剂是指配制和稀释待测抑制剂所用的溶剂。

- b. 各孔加入COX-2 Probe 5微升。
c. 各孔快速加入COX-2 Substrate工作液5微升，混匀。
注：加入COX-2 Substrate工作液后反应即会开始，如果孔数较多，可以在低温操作或使用排枪操作以减小各孔间加入COX-2 Substrate工作液的时间差而导致的误差，混匀也可以在培养板振荡器上进行。
d. 37°C避光孵育5分钟后进行荧光测定。激发波长为560nm，发射波长为590nm。当荧光读数偏低时，也可适当延长孵育时间至10-20分钟。
注1：如果用于测定的荧光酶标仪能够进行动力学读数，可将仪器温度设定、并提前升温至37°C，COX-2 Substrate工作液加入并混匀后立即放入荧光酶标仪进行测定。建议将测定总时间设为5分钟或10分钟，对应的测定间隔时间设为1分钟或2分钟。
注2：抑制剂的抑制效果可能会随着孵育时间的延长存在些微的波动，最佳孵育时间可以自行摸索调整。

4. 计算：

- a. 计算每个样品孔和空白对照孔的平均荧光值，可分别记录为RFU_{空白对照}、RFU_{100%酶活性对照}、RFU_{阳性抑制剂对照}和RFU_{样品}。RFU, Relative Fluorescence Unit。
b. 计算每个样品的抑制百分率。计算公式如下：
$$\text{抑制率}(\%) = (\text{RFU}_{100\% \text{酶活性对照}} - \text{RFU}_{\text{样品}}) / (\text{RFU}_{100\% \text{酶活性对照}} - \text{RFU}_{\text{空白对照}}) \times 100\%$$

c. 对于检测发现有效的抑制剂，通过检测该抑制剂的剂量效应就可以测定出该抑制剂的IC50。本试剂盒检测Celecoxib抑制效果的检测结果如图2所示，IC50约为30nM。

参考文献：

1. Yokoyama C, Tanabe T. Biochem Biophys Res Commun. 1989. 165(2):888-894.
2. Funk CD, Funk LB, Kennedy ME, Pong AS, Fitzgerald GA. FASEB J. 1991. 5(9):2304-2312.
3. Chandrasekharan NV, Dai H, Roos KL, et al. Proc Natl Acad Sci U S A. 2002. 99(21):13926-13931.

相关产品：

产品编号	产品名称	包装
S0165S	环氧酶-1 (COX-1)抑制剂筛选试剂盒	100 次
S0168	环氧酶-2 (COX-2)抑制剂筛选试剂盒	100 次

Version 2024.05.26