KIAZIST

Life Sciences

کیت اندازه گیری فعالیت کاتالاز

Catalase Activity Kit (Purpald)

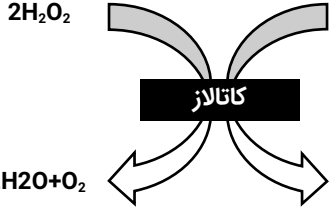
KCAT96

اصول کار

آنزیم کاتالاز یکی از اصلی ترین آنزیم های خنثی کننده هیدروژن پراکسید می باشد و در تمام موجودات زنده که در مواجهه با اکسیژن هستند، بیان می شود. این آنزیم یکی از سدهای دفاعی در برابر گونه های فعال اکسیژن می باشد و بنابراین خواص آنتی اکسیدانی از خود نشان می دهد. اندازه گیری فعالیت آن می تواند نشانگر بسیاری از ناهنجاری ها و تغییرات در بدن موجود زنده باشد.

در این آزمایش کاتالاز در حضور متانول فعالیت پراکسیدازی دارد و سپس در حضور مهار کننده خود، متوقف شده و فرمالدهید تولیدی از آن با Purpald واکنش داده و رنگ بنفش تولید می کند. این رنگ در طول موج ۵۴۰ نانومتر جذب دارد.

اصول واکنش:



جذب در 540 nm

اطلاعات کلی و محتویات

نگهداری و حمل:

در دمای 4°C نگهداری شود. حمل توسط یخ مرطوب انجام می شود.

محدوده اندازه گیری دینامیک: 2-35 nmol/min/mL

حساسیت: 0.5 nmol/min/mL

مقدار نمونه پیشنهادی

نمونه	حداکثر	مطلوب
Tissues from animal/plant	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	Catalase Assay Buffer 10X	5 mL
۲	Catalase Sample Buffer 10X	5 mL
۳	Catalase Chromogen	3 mL
۴	Catalase Formaldehyde Standard	50 uL
۵	Catalase Stop Solution	3 mL
۶	Catalase H_2O_2	300 uL
۷	Catalase Methanol	4 mL
۸	Catalase Periodate	2 mL
۹	96-well Clean photometric Plate	1 PCs
۱۰	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 ۵۲۰-۵۶۰ نانومتر
- بافر PBS یا بافر استخراج آنزیم کیازیست (KPEX50)
- مهار کننده پروتئازها (پیشنهادی کیازیست KPI100)
- کیت اندازه گیری پروتئین جهت نرمال سازی (KBCA96 or KBRD96)

نکته: قبل از شروع، آزمایش توسط تعدادی نمونه جهت مشخص ساختن فعالیت آنزیم به صورت پایلت (Pilot) به همراه استاندارد انجام شود.

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

آماده سازی نمونه

هموژن کردن بافت

نمونه بافت: ۱۰ تا ۲۰ میلی گرم از بافت را توسط سونیکاتور و یا هموژنایزر در بافر PBS (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 پلت سلولی را در بافر PBS (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 پلت سلولی رادر بافر PBS (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

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.**
- **در صورت مشاهده رسوب در محلول ها، با تکان دادن ظرف رسوب ها را حل نمایید.**
- **Catalase Assay Buffer 1X: ۲ میلی لیتر از Catalase Assay Buffer 10X را با ۱۸ میلی لیتر آب دیونیزه ترکیب کنید. این محلول تا ۳ ماه دردمای 4°C پایداراست.**
- **Catalase Sample Buffer 1X: ۲ میلی لیتر از Catalase Sample Buffer 10X را با ۱۸ میلی لیتر آب دیونیزه ترکیب کنید. این محلول تا ۳ ماه دردمای 4°C پایداراست.**
- **Catalase Substrate: ۸۵ میکرو لیتر از Catalase H2O2 را به ۱۰ میلی لیتر آب دیونیزه اضافه کنید. این محلول در دمای اتاق تا ۲ ساعت پایدار است.**
- **بقیه موارد آماده به مصرف هستند.**

آماده سازی استاندارد

- **Catalase Formaldehyde Standard: از ویال استاندارد مقدار ۳/۲ میکرولیتر برداشته و با Catalase Sample Buffer 1X به حجم ۱۰ میلی لیتر برسانید.**
- **این محلول دارای غلظت ۵ میلی مولار Formaldehyde خواهد بود.**
- **سپس از آن طبق جدول زیر برای ساخت استاندارد استفاده کنید.**

کد تیوب	Sample Buffer 1X (uL)	Formaldehyde 5 mM (uL)	غلظت نهایی استاندارد (uM)
A	۱۰۰۰	۰	۰
B	۹۹۰	۱۰	۵۰
C	۹۷۰	۳۰	۱۵۰
D	۹۴۰	۶۰	۳۰۰
E	۹۱۰	۹۰	۴۵۰
F	۸۸۰	۱۲۰	۶۰۰
G	۸۵۰	۱۵۰	۷۵۰

استانداردها برای یک ساعت پایداری مناسبی دارند.

نحوه انجام آزمایش

۱. ابتدا مقدار 20 uL از نمونه، استاندارد و بلانک (بافر لیزکننده استفاده شده) را به چاهک های مورد نظر اضافه نمایید.

۲. سپس مقدار 100 uL از Catalase Assay Buffer 1X به هر چاهک اضافه کنید.

۳. در ادامه 30 uL از Catalase Methanol را به هر چاهک اضافه کرده و خوب هم بزنید.

۴. در ادامه توسط سمپلر چند کاناله 20 uL از Catalase Substrate به هر چاهک اضافه کرده تا واکنش شروع شود. پلیت را پوشانده و در دمای اتاق به مدت ۲۰ دقیقه انکوبه کنید.

۵. سپس 30 uL از Catalase Stop Solution به هرچاهک اضافه کرده و در ادامه 30 uL از Catalase Chromogen را به هرچاهک اضافه کرده و در دمای اتاق و در تاریکی به مدت ۱۰ دقیقه انکوبه کنید.

۶. پس از این زمان 10 uL از Catalase Periodate به چاهک ها اضافه کرده و پس از پنج دقیقه در طول موج 520-560 nm جذب را بخوانید.

نکته: در صورتیکه در چاهک نمونه ها کدورت دیده شد نشانه غلظت بالای پروتئین می باشد. نمونه ها را به مقداری که کدورت از بین برود رقیق کنید و میزان رقیق سازی را به عنوان ضریب رقت در نظر بگیرید.

این کیت به دلیل حساسیت بالا نیاز به رقیق سازی نمونه دارد. (پیشنهادی: برای سرم 1:5، برای لیزات بافتی 1:20 تا 1:50، برای سلول 1:20).

نحوه محاسبه

۱. ابتدا از چاهک های دوتایی میانگین بگیرید.

۲. جذب بلانک را از نمونه ها کم کنید.

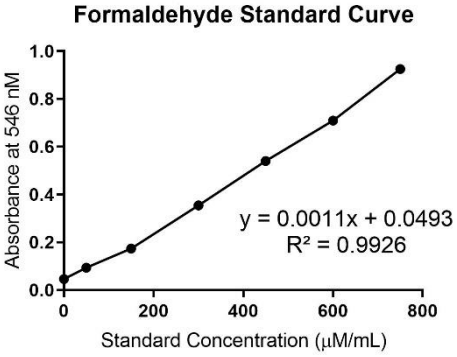
۳. سپس توسط یک نرم افزار مناسب (مانند اکسل یا Curve Expert) منحنی استاندارد را رسم کرده و غلظت نمونه ها را بر اساس µM استاندارد Formaldehyde محاسبه نمایید.

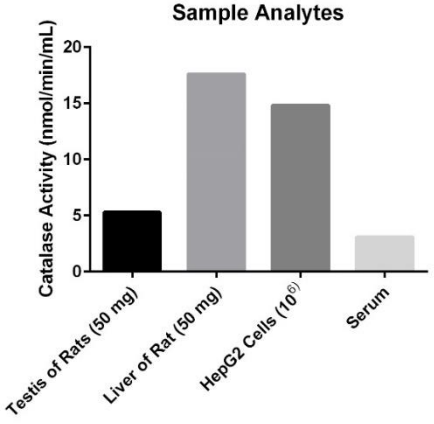
۴. در آخر µM هر نمونه را در فرمول زیر قرار دهید تا فعالیت آنزیم محاسبه شود:

$$\text{CAT Activity} = \frac{\mu M\ of\ Sample}{20} \times \frac{0.24}{0.02} \times \text{ضریب رقت نمونه}$$

- واحد فعالیت آنزیم برحسب nmol/min/mL یا mU/mL می باشد.
- جهت نرمال سازی مقادیر بهتر است میزان پروتئین نمونه ها سنجیده شود و مقادیر برحسب میلی گرم پروتئین نرمال سازی شوند، بنابراین می توان واحد را بر حسب nmol/min/mg یا mU/mg of protein گزارش کرد.

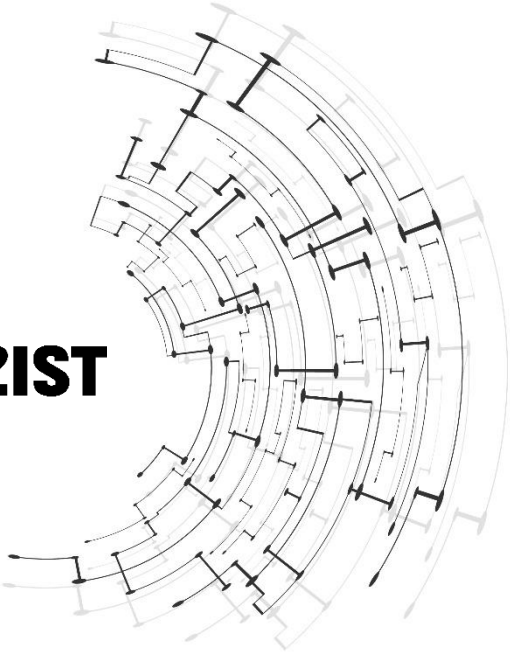
نمونه تست و منحنی استاندارد





مشکل یابی

مشکل	علت	راه حل
جذب پایین منحنی استاندارد	-مقدار نمونه اولیه کم	-مقدار نمونه اولیه را زیاد کم کنید -از بافر مناسب استخراج همراه با مهارکننده پروتئاز استفاده کنید
جذب بالای منحنی استاندارد	-مقدار نمونه اولیه زیاد آنزیم	-مقدار نمونه را کاهش دهید
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