کیت سنجش فعالیت آنزیم کاتالاز
Nactaz™ (Catalase activity Assay Kit)

مقدمه:

گونه‌های فعال اکسیژن (ROS=Reactive Oxygen Species) که شامل مولکول‌های بسیار فعال واجد اکسیژن هستند، از ترکیبات اکسیدکننده‌ی رایج محسوب شده و با حمله به مولکول‌های مختلف، ضمن اکسید کردن آن‌ها محصولات اکسید شده‌ی ثانویه نیز تولید می‌کنند. تعدادی از آنزیم‌ها نقش آنتی‌اکسیدانی مهمی را در برابر حمله‌ی گونه‌های فعال اکسیژن ایفا می‌کنند. از مهمترین این آنزیم‌ها می‌توان به کاتالاز اشاره کرد.

کاتالاز (EC 1.11.1.6) آنزیم رایج موجود در سلول‌های پستانداران و غیرپستانداران است و تجزیه پراکسیدهیدروژن به آب و اکسیژن را کاتالیز می‌کند و می‌تواند در هر ثانیه میلیون‌ها مولکول پراکسید هیدروژن را به آب و اکسیژن تبدیل کند.

پراکسید هیدروژن (H_2O_2) یکی از ترکیبات مولد گونه‌های فعال اکسیژن است و محصول متابولیسم طبیعی هوازی بدن می‌باشد. اما این محصول جانبی برای سلول‌های یوکاریوتی سمی بوده و می‌تواند باعث آسیب DNA، اکسیداسیون چربی‌ها و پروتئین‌ها و منجر به جهش‌زایی و یا حتی مرگ سلول شود. برای جلوگیری از آسیب سلول‌ها و بافت‌ها، پراکسید هیدروژن توسط آنزیم کاتالاز به اکسیژن و آب تبدیل می‌شود. کاتالاز یوکاریوتی دارای هِم است و در کبد، کلیه و گلبول‌های قرمز بالاترین غلظت و در بافت همبند کمترین غلظت را داشته و در پراکسی‌زوم سلول متمرکز شده است.

اساس این روش بر مبنای واکنش آنزیم کاتالاز (فعالیت پراکسیداتیک آنزیم کاتالاز) موجود در نمونه می‌باشد. در این واکنش ابتدا آنزیم کاتالاز در حضور پراکسیدهیدروژن و متانول (به عنوان دهنده هیدروژن) باعث تولید نوعی آلدهید (فرمالدهید) می‌شود. در نهایت هیدروکسید پتاسیم به واکنش خاتمه داده، فرمالدهید حاصل، در ترکیب با کروموژن (ماده رنگی) به روش طیف سنجی در طول موج 540 تا 550 نانومتر قابل سنجش می‌باشد.

کیت سنجش فعالیت کاتالاز (Nactaz™) شرکت نوند سلامت، روشی ساده، تکرارپذیر و استاندارد برای اندازه‌گیری میزان فعالیت کاتالاز می‌باشد که در نمونه‌های بیولوژیکی مانند سرم، پلاسما، ادرار، بافت هموژنه و لیزات سلولی استفاده می‌شود.

روش کار:

1) آماده‌سازی نمونه‌های بافتی:

برای لیز نمونه‌های بافتی، در ابتدا حدود 50 تا 100 میلی‌گرم از نمونه را وزن کرده و پس از شستشوی کامل با PBS سرد، با یک میلی‌لیتر از بافر لیزکننده (سرد) موجود در کیت هموژن نمائید. سپس در 8000 دور به مدت 10 دقیقه سانتریفیوژ (نوند سلامت در این مرحله استفاده از سانتریفیوژ یخچالدار را توصیه می‌کند) کرده و برای انجام آزمایش از مایع‌رویی به عنوان نمونه استفاده نمائید (توجه داشته باشید که مایع رویی تا زمان استفاده باید در کنار یخ و یا در یخچال نگهداری شود).

برای اندازه‌گیری کاتالاز در سلول، 10^6 سلول در یک میلی‌لیتر بافر لیزکننده هموژنایز کرده و در 8000 دور به مدت 10 دقیقه سانتریفیوژ کنید. از محلول رویی به عنوان نمونه استفاده کنید. توجه داشته باشید که برای جداسازی سلول‌ها از کف پلیت، از مواد پروتئولیتیک (مانند تریپسین) استفاده نکنید.

2) آماده‌سازی معرف‌ها:

- **$Assay\ Buffer_{4x}$**: یک میلی‌لیتر از بافر را با 3 میلی‌لیتر آب دیونیزه مخلوط و از رسیدن محلول به pH=7 اطمینان حاصل کنید (نوند سلامت استفاده از NaOH را برای تنظیم pH توصیه می‌کند).
- **$Sample\ Buffer_{10x}$**: یک میلی‌لیتر از بافر را با 9 میلی‌لیتر آب دیونیزه مخلوط و پس از کنترل pH=7 به عنوان بافر نمونه برای رقیق کردن، استفاده نمائید (نوند سلامت استفاده از NaOH را برای تنظیم pH توصیه می‌کند).
- **$Lysis\ Buffer_{10x}$**: یک میلی‌لیتر از بافر را با 9 میلی‌لیتر آب دیونیزه مخلوط و پس از کنترل pH=7 به عنوان بافر نمونه استفاده کنید (نوند سلامت استفاده از NaOH را برای تنظیم pH توصیه می‌کند).
- **R2**: 70 میکرولیتر از R2 را با 9/93 میلی‌لیتر آب دیونیزه مخلوط و در ادامه روش کار از آن استفاده نمائید. توجه داشته باشید ماندگاری محلول حاصل یک ساعت بوده و توصیه می‌شود که در زمان شروع آزمایش تهیه شود.
- سایر معرف‌ها نیاز به آماده‌سازی ندارند.

3) روش اندازه‌گیری:

1) 50 میکرولیتر از Assay Buffer را با 50 میکرولیتر R1 مخلوط و سپس 10 میکرولیتر از R2 آماده شده را به مخلوط اضافه کرده و در ادامه برای شروع واکنش، 100 میکرولیتر از نمونه‌های بیولوژیکی (که شامل سرم، پلاسما، لیز سلول و بافت هموژن‌شده می‌باشد) و یا استاندارد با غلظت های مختلف را به مخلوط اضافه نمائید. لوله ها را با کاور پوشانده و به مدت 20 دقیقه در دمای کمتر از 20 درجه سانتیگراد به صورت مداوم و آرام تکان دهید (Shake کنید و یا در Shaker قرار دهید).

2) در ادامه، 100 میکرولیتر از R4 (کروموژن) به لوله‌ها اضافه نموده پس از مخلوط کردن، 40 میکرولیتر از R3 را برای خاتمه واکنش اضافه و مخلوط نمائید.

3) در ادامه لوله ها را با کاور پوشانده و به مدت 10 دقیقه در دمای کمتر از 20 درجه سانتیگراد به صورت مداوم و آرام تکان دهید (Shake کنید و یا در Shaker قرار دهید).

Navand Lab Kit
تلفن تماس: ۰۹۰۱۴۱۱۴۰۹۷ وبسایت: www.navandsalamat.com ایمیل: navandsalamat@gmail.com
آدرس: ارومیه، کیلومتر ۱۱ جاده سرو، پارک علم فناوری آذربایجان غربی، شرکت نوند سلامت - کدپستی: ۵۷۵۶۱۱۵۳۲۳

4) پس از 10 دقیقه انکوباسیون، 50 میکرولیتر از R5 را اضافه و پس از مخلوط کردن، در 4000 دور به مدت 5 دقیقه سانتریفیوژ نمائید.

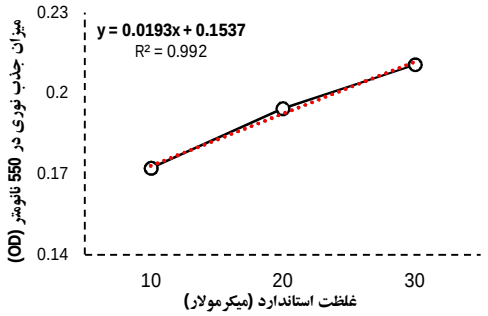
5) مقدار 200 میکرولیتر از هر لوله را به چاهک های پلیت 96 خانه اضافه نموده و با الایزار ریدر در طول موج 550±20 نانومترقرائت نمائید.

- توجه داشته باشید برای رسیدن به نتایج قابل اتکا باید میزان فعالیت آنزیم کاتالاز در نمونه‌های شما مابین 5 تا 30 میکرومول فرمالدهید باید باشد. در غیر این صورت بهتر است نمونه‌ها را با Sample Buffer رقیق نموده و ضریب رقت را در آخر وارد فرمول نمائید.

6) برای رسم منحنی استاندارد، استاندارد موجود در کیت را با استفاده از جدول زیر رقیق نمائید:

لوله (چاهک)	استاندارد (میکرولیتر)	Sample Buffer (میکرولیتر)	غلظت نهایی استاندارد (μM)
A	0	1000	**0**
B	10	990	**10**
C	20	980	**20**
D	30	970	**30**

پس از تهیه غلظت‌ها، طبق روش اندازه‌گیری (بند3) به جای نمونه از غلظت‌های مختلف استاندارد تهیه شده، استفاده نموده (برای رسم منحنی از میانگین 3 بار تکرار غلظت‌های مختلف استفاده نمائید) و در آخر با توجه به میانگین اعداد به دست آمده از غلظت های 10، 20 و 30 میکرومول نموداری خط را با یکی از نرم افزارهای آماری همانند اکسل ترسیم و از فرمول خط و ضریب رگرسیون برای محاسبه میزان فعالیت آنزیم کاتالاز استفاده نمائید.



4) محاسبه

فرمول خط حاصل از غلظت های مختلف استاندارد (فرمالدئید) به صورت زیر خواهد بود:

$$y = Ax + B$$

y : جذب نوری استاندارد

A : شیب خط (مثال در فرمول نمودار بالا این عدد برابر با 0/0193 می باشد)

x : غلظت فرمالدهید

B : عرض از مبدا (مثال در فرمول نمودار بالا این عدد برابر با 0/1537 می‌باشد)

که با توجه به فرمول بالا میزان فعالیت آنزیم کاتالاز را محاسبه می گردد:

$$Formaldehude\ (\mu M) = \frac{OD\ Sample - B}{A} \times 2.2$$

$$catalase\ activity = \frac{Sample\ (\mu M)}{20\ min}$$

واحد فعالیت کاتالاز عبارت است از : nmol/min/ml (or mg pro)

توصیه‌ها:

- کیت در یخچال (دمای 2-8 درجه سانتی گراد) نگهداری شود اما معرف‌ها قبل از شروع آزمایش باید به دمای محیط (ترجیحا دمای 20 درجه سانتی گراد) رسیده و قبل از استفاده ورتکس نمائید به گونه‌ایی که هیچ کریستالی در معرف‌ها دیده نشود.
- توصیه می‌شود از هر نمونه 3 بار تکرار انجام دهید و میانگین آن‌ها را به‌عنوان نتیجه نهایی در نظر بگیرید. همچنین برای رسم منحنی **حتماً** از 3 بار تکرار در غلظت‌های مختلف لحاظ شده و میانگین را به‌عنوان عدد مرجع در نظر بگیرید.
- رعایت زمان‌های ذکر شده در روش کار به خاطر اندازه‌گیری فعالیت آنزیم ضروری می‌باشد.
- در نمونه‌های بافتی و لیزات سلولی اندازه‌گیری پروتئین نیز توصیه می‌شود که می‌توانید بدین منظور از کیت Nadfrod™ نوند سلامت استفاده نمائید.
- در زمان کار با کیت رعایت اصول ایمنی آزمایشگاهی الزامی می‌باشد.

Navand Lab Kit
تلفن تماس: ۰۹۰۱۴۱۱۴۰۹۷ وبسایت: www.navandsalamat.com ایمیل: navandsalamat@gmail.com
آدرس: ارومیه، کیلومتر ۱۱ جاده سرو، پارک علم فناوری آذربایجان غربی، شرکت نوند سلامت - کدپستی: ۵۷۵۶۱۱۵۳۲۳