



9. Lysing Buffer : 5 میلی لیتر (کیت 48 تست) / 10 میلی لیتر (کیت 96 تست) / 20 میلی لیتر (کیت 192 تست)

کیت سنجش فعالیت آنزیم کاتالاز Nactaz™ (Catalase activity Assay Kit) V-0.5 microplate Reader

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 پراکسید هیدروژن 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 هوای 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 هم 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 پراکسیدازیک آنزیم کاتالاز) موجود در نمونه می‌باشد. در این واکنش ابتدا آنزیم کاتالاز در حضور پراکسید هیدروژن و متانول (به عنوان دهنده هیدروژن) باعث تولید نوعی آلدئید (فرمالدهید) می‌شود. در نهایت هیدروکسید پتاسیم به واکنش خاتمه داده، فرمالدهید حاصل، در ترکیب با کروموزن (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 هموزنه و لیزات سلولی استفاده می‌شود.

محتویات کیت:

1. Reagent 1 : 2500 میکرولیتر (کیت 48 تست) / 5 میلی لیتر (کیت 96 تست) / 10 میلی لیتر (کیت 192 تست)
2. Reagent 2 : 500 میکرولیتر (کیت 48 تست) / 500 میکرولیتر (کیت 96 تست) / 500 میکرولیتر (کیت 192 تست)
3. Reagent 3 : 2500 میکرولیتر (کیت 48 تست) / 5 میلی لیتر (کیت 96 تست) / 10 میلی لیتر (کیت 192 تست)
4. Reagent 4 : 5 میلی لیتر (کیت 48 تست) / 10 میلی لیتر (کیت 96 تست) / 20 میلی لیتر (کیت 192 تست)
5. Reagent 5 : 2500 میکرولیتر (کیت 48 تست) / 5 میلی لیتر (کیت 96 تست) / 10 میلی لیتر (کیت 192 تست)
6. Assay Buffer : 750 میکرولیتر (کیت 48 تست) / 1500 میکرولیتر (کیت 96 تست) / 3 میلی لیتر (کیت 192 تست)
7. Standard : 500 میکرولیتر (کیت 48 تست) / 500 میکرولیتر (کیت 96 تست) / 500 میکرولیتر (کیت 192 تست)
8. Sample Buffer : 2500 میکرولیتر (کیت 48 تست) / 5 میلی لیتر (کیت 96 تست) / 5 میلی لیتر (کیت 192 تست)

موارد مورد نیاز که در داخل کیت موجود نیست:

- PBS (برای نمونه‌های بافتی)
- هموژنایزر شیشه ای (هموژنایزر نوند سلامت با کد محصول 16010)
- سانتریفیوژ
- میکروپلیت ریدر با قابلیت خوانش 550 نانومتر

روش کار:

1) آماده‌سازی نمونه‌های بافتی:

برای لیز نمونه‌های بافتی، در ابتدا حدود ۵۰ تا ۱۰۰ میلی گرم از نمونه را وزن کرده و پس از شستشوی کامل با PBS سرد، با یک میلی لیتر از بافر لیزکننده (سرد) موجود در کیت هموزن نمایید. سپس در ۸۰۰۰ دور به مدت ۱۰ دقیقه سانتریفیوژ (نوند سلامت در این مرحله استفاده از سانتریفیوژ یخچالدار را توصیه می‌کند) کرده و برای انجام آزمایش از مایع رویی به عنوان نمونه استفاده نمایید (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 میلی لیتر بافر لیزکننده هموزنایز کرده و در ۸۰۰۰ دور به مدت ۱۰ 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.

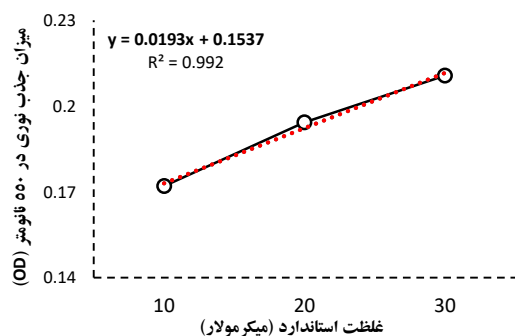
2) آماده‌سازی معرف‌ها:

- **Assay Buffer_{4x}**: یک میلی لیتر از بافر را با ۳ میلی لیتر 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 میلی لیتر از بافر را با ۹ میلی لیتر آب دیونیزه مخلوط و پس از کنترل pH=7 به عنوان بافر نمونه برای رقیق کردن، استفاده نمایید (نوند سلامت استفاده از NaOH را برای تنظیم pH توصیه می‌کند).
- **Lysis Buffer_{10x}**: یک میلی لیتر از بافر را با ۹ میلی لیتر 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).



لوله (چاهک)	استاندارد (میکرولیتر)	Sample Buffer (میکرولیتر)	غلظت نهایی (استاندارد (μM)
A	۰	۱۰۰۰	۰
B	۱۰	۹۹۰	۱۰
C	۲۰	۹۸۰	۲۰
D	۳۰	۹۷۰	۳۰

پس از تهیه غلظت‌ها، طبق روش اندازه‌گیری (بند ۳) به جای نمونه از غلظت‌های مختلف استاندارد تهیه شده، استفاده نموده (برای رسم منحنی از میانگین ۳ بار تکرار غلظت‌های مختلف استفاده نمائید) و در آخر با توجه به میانگین اعداد به دست آمده از غلظت‌های ۱۰، ۲۰ و ۳۰ 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 غلظت‌های 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 ۰/۰۱۹۳ می باشد)

x : غلظت فرمالدئید

B : عرض از مبدا (مثال در فرمول نمودار بالا این عدد برابر با ۰/۱۵۳۷ می باشد)

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

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

- **R2:** ۷۰ میکرولیتر از R2 را با ۹/۹۳ میلی لیتر 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) ۵۰ میکرولیتر از Assay Buffer را با ۵۰ میکرولیتر R1 مخلوط و سپس ۱۰ میکرولیتر از R2 آماده شده را به مخلوط اضافه کرده و در ادامه برای شروع واکنش، ۱۰۰ میکرولیتر از نمونه‌های بیولوژیکی (که شامل سرم، پلاسما، لیز سلول و بافت هموژن شده می‌باشد) و یا استاندارد با غلظت‌های مختلف را به مخلوط اضافه نمائید. لوله‌ها را با کاور پوشانده و به مدت ۲۰ دقیقه در دمای کمتر از ۲۰ درجه سانتیگراد به صورت مداوم و آرام تکان دهید (Shake کنید و یا در Shaker قرار دهید).

(2) در ادامه، ۱۰۰ میکرولیتر از R4 (کروموژن) به لوله‌ها اضافه نموده پس از مخلوط کردن، ۴۰ میکرولیتر از R3 را برای خاتمه واکنش اضافه و مخلوط نمائید.

(3) در ادامه لوله‌ها را با کاور پوشانده و به مدت ۱۰ دقیقه در دمای کمتر از ۲۰ درجه سانتیگراد به صورت مداوم و آرام تکان دهید (Shake کنید و یا در Shaker قرار دهید).

(4) پس از ۱۰ دقیقه آنکوباسیون، ۵۰ میکرولیتر از R5 را اضافه و پس از مخلوط کردن، در ۴۰۰۰ دور به مدت ۵ دقیقه سانتریفیوژ نمائید.

(5) مقدار ۲۰۰ میکرولیتر از هر لوله را به چاهک‌های پلیت ۹۶ خانه اضافه نموده و با الایزار ریدر در طول موج 550 ± 20 نانومتر قرائت نمائید.

- توجه داشته باشید برای رسیدن به نتایج قابل اتکا باید میزان فعالیت آنزیم کاتالاز در نمونه‌های شما مابین ۵ تا ۳۰ میکرومول فرمالدئید 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:



- توصیه می‌شود از هر نمونه ۳ بار تکرار انجام دهید و میانگین آن‌ها را به‌عنوان نتیجه نهایی در نظر بگیرید. همچنین برای رسم منحنی حتماً از ۳ 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 نمایید.
- در زمان کار با کیت رعایت اصول ایمنی آزمایشگاهی الزامی می‌باشد.

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

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

توصیه‌ها:

- کیت در یخچال (دمای ۲-۸ درجه سانتی‌گراد) نگهداری شود اما معرف‌ها قبل از شروع آزمایش باید به دمای محیط (ترجیحاً دمای ۲۰ درجه سانتی‌گراد) رسیده و قبل از استفاده ورتکس نمائید به گونه‌ای که هیچ کریستالی در معرف‌ها دیده نشود.

عیب یابی:

مشکل	احتمالات موجود	راه حل های پیشنهادی
عدم کارکرد سنجش یا آزمایش	سرد بودن بافر آزمایش	دمای بافر باید به دمای اتاق رسیده باشد
	عدم رعایت ترتیب مراحل آزمایش	به پروتکل موجود مراجعه کرده و دقیقاً پیروی نمایید
	پلیت ریدر در طول موج نادرست	تنظیمات فیلتر دستگاه را چک نمایید
نمونه‌ها با قرائت (خوانش) نامنظم یا نامعقول	نمونه‌ها در بافرهای متفاوتی تهیه شده باشند	از بافر موجود در کیت استفاده نموده و یا به دستورالعمل موجود در پروتکل مراجعه نمایید
	نمونه‌های کشت بافت/سلول به صورت کامل هموزن نشده باشند	هموزن کردن نمونه را تکرار نمایید. مدت زمان مرحله‌ی همگن سازی را افزایش دهید
	استفاده از نمونه‌های چند بار دفریز شده	اگر نمونه‌ها چندین بار مورد استفاده قرار خواهند گرفت آن‌ها را به دو یا سه قسمت تقسیم نمایید
	وجود ماده‌ی مداخله گر در نمونه	در صورت امکان نمونه را بیشتر رقیق نمایید
	استفاده از نمونه‌های قدیمی یا نامناسب	از نمونه‌های تازه استفاده کرده و تا زمان استفاده به درستی نگهداری شود
	دمای نامناسب ترکیبات	اجازه دهید تمام ترکیبات به دمای اتاق رسیده، سپس به آرامی ترکیب نمایید
خوانش بالا / پایین در نمونه‌ها و استانداردها	استفاده از کیت منقضی شده و یا نگهداری نامناسب معرف‌ها	تاریخ انقضای کیت را چک نموده و معرف‌ها را در شرایط مناسب نگهداری نمایید
	قرار گرفتن طولانی مدت معرف‌ها در معرض یخ	قبل از استفاده محلول واکنش تازه آماده کنید
	زمان و درجه حرارت نامناسب انکوباسیون	به پروتکل مراجعه کنید و زمان و دمای مناسب انکوباسیون را بررسی نمایید
	استفاده از حجم‌های نامناسب	از سمپلر کالیبره شده استفاده نموده و مواد را تقسیم نمایید
منحنی استاندارد غیر خطی	استفاده از ترکیبات نیمه گرم شده	قبل از آماده سازی محلول واکنش، همه اجزاء را به دمای مناسب رسانده سپس دوباره ترکیب نمایید



خطاهای مرتبط با پیپت کردن در آماده سازی محلول های استاندارد	از حجم های بالا استفاده نمایید
خطاهای پیپت کردن در محلول واکنش	محلول کار را هر زمان که ممکن است حاضر نمایید
تشکیل حباب های هوا در چاهک ها	محتویات پیپت را به آرامی در چاهک ها خالی نمایید
غلظت محلول استاندارد نادرست است	به دستورالعمل استاندارد رقت در پروتکل مراجعه کنید
خطاهای محاسبات	بعد مراجعه به پروتکل ، محاسبات را دوباره انجام دهید
نمونه ها در طول موج نادرست خوانده شوند	تنظیمات فیلتر و دستگاه را بررسی نمایید
نمونه ها دارای محتویات مداخله گر باشند	در صورت امکان نمونه را بیشتر رقیق نمایید
خواندن نمونه در بالا / زیر محدوده خطی	نمونه های غلیظ یا رقیق کرده تا خوانایی در محدوده خطی باشند
نتایج غیر منتظره	