



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 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 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 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 پراکسیداتیکی 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 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 ۵۴۰ تا ۵۵۰ 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.

محتوای کیت:

ردیف	دمای نگهداری	نام ماده	تست ۴۸	تست ۹۶	تست ۱۹۲
۱	2-8 °C	Reagent 1	۱/۵ میلی‌لیتر	۳ میلی‌لیتر	۶ میلی‌لیتر
۲	2-8 °C	Reagent 2	۵۰۰ میکرولیتر	۵۰۰ میکرولیتر	۵۰۰ میکرولیتر
۳	2-8 °C	Reagent 3	۱/۵ میلی‌لیتر	۳ میلی‌لیتر	۶ میلی‌لیتر
۴	2-8 °C	Reagent 4	۱/۵ میلی‌لیتر	۳ میلی‌لیتر	۶ میلی‌لیتر
۵	2-8 °C	Reagent 5	۵۰۰ میکرولیتر	۱ میلی‌لیتر	۲ میلی‌لیتر
۶	2-8 °C	Sample Buffer 10X	۸ میلی‌لیتر	۱۲ میلی‌لیتر	۲۰ میلی‌لیتر
۷	2-8 °C	Assay Buffer 10X	۵۰۰ میکرولیتر	۱ میلی‌لیتر	۲ میلی‌لیتر
۸	2-8 °C	Standard solution	۲۰۰ میکرولیتر	۲۰۰ میکرولیتر	۲۰۰ میکرولیتر
۹	2-8 °C	Lysing Buffer 10X	۵ میلی‌لیتر	۱۰ میلی‌لیتر	۲۰ میلی‌لیتر
۱۰	-	96-Well plate	۱ عدد	۱ عدد	۲ عدد

موارد مورد نیاز که در داخل کیت موجود نیست:

- میکروپلیت‌ریدر با قابلیت اندازه‌گیری جذب (OD) ۵۵۰ نانومتر
- هموژنایزر شیشه‌ای (در صورت استفاده از بافت به عنوان نمونه)
- فسفات بافر (در صورت استفاده از بافت به عنوان نمونه)
- سانتریفوژ
- نرمال سالین برای نمونه‌های اریتروسیت



مراحل انجام آزمایش:

(۱) آماده‌سازی نمونه‌ها:

نمونه‌های بافتی: برای لیز نمونه‌های بافتی، در ابتدا حدود ۵۰ تا ۱۰۰ میلی‌گرم از نمونه را وزن کرده و پس از شستشوی کامل با PBS سرد، با ۱ میلی‌لیتر از Lysing Buffer (سرد) موجود در کیت هموژن نمائید. 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 مایع‌رویی به عنوان نمونه استفاده نمائید (توجه داشته باشید که مایع‌رویی تا زمان استفاده باید در کنار یخ و یا در یخچال نگهداری شود).

نمونه‌های سلولی: برای اندازه‌گیری کاتالاز در سلول، ۱۰^۶ سلول در یک میلی‌لیتر Lysing Buffer هموژنایز کرده و در ۸۰۰۰ دور به مدت ۱۰ دقیقه سانتریفیوژ کنید. از محلول‌رویی به عنوان نمونه استفاده کنید. توجه داشته باشید که برای جداسازی سلول‌ها از کف پلیت، از مواد پروتئولیتیک (مانند تریپسین) استفاده نکنید.

نمونه‌های پلاسما و لیزات اریتروسیت: خون را با استفاده از مواد ضد انعقاد مانند هپارین، سترات یا EDTA تهیه کنید. نمونه را در ۱۰۰۰ دور در دقیقه به مدت ۱۰ دقیقه سانتریفیوژ کرده و مایع زرد رویی (پلاسما) را بدون اینکه با لایه زیرین ترکیب شود جدا کنید. نمونه پلاسما را تا زمان سنجش روی یخ نگهدارید. جهت نگهداری طولانی مدت، پلاسما را در دمای منفی ۸۰ درجه قرار دهید که در این صورت ماندگاری نمونه ۱ ماه خواهد بود. پس از سانتریفیوژ برای اندازه‌گیری کاتالاز در نمونه‌های اریتروسیت، لایه زیرین لوله سانتریفیوژ شده را که حاوی اریتروسیت است، ۴ بار با نرمال سالین شستشو دهید (بدین صورت که پس از افزودن نرمال سالین با حجم مساوی، در ۳۰۰۰ دور در دقیقه به مدت ۵ دقیقه سانتریفیوژ کنید. سپس مایع رویی رو برای حذف پلاسما، به صورت کامل دور بریزید و این عمل را ۴ بار تکرار کنید). پس از سانتریفیوژ آخر می‌توانید از مایع زیرین که حاوی اریتروسیت است جهت سنجش کاتالاز استفاده نمایید (نوند سلامت در مورد نمونه‌های اریتروسیت توصیه می‌کند نمونه را ۱۰ برابر با آب مقطر رقیق کنید. این عمل باعث پاره شدن اریتروسیت می‌شود که در نهایت می‌توانید پس از اضافه کردن آب مقطر در ۱۰۰۰۰ دور در دقیقه به مدت ۵ دقیقه سانتریفیوژ کرده و از مایع رویی به عنوان نمونه استفاده نمائید). جهت نگهداری طولانی مدت، اریتروسیت را در دمای منفی ۸۰ درجه قرار دهید که در این صورت ماندگاری نمونه ۱ ماه خواهد بود.

نمونه‌های سرمی: نمونه خونی را بدون استفاده از مواد ضد انعقاد تهیه و اجازه دهید تا نمونه خونی به مدت ۳۰ دقیقه در دمای اتاق لخته شود. نمونه را در ۲۰۰۰ دور در دقیقه به مدت ۱۵ دقیقه و دمای ۴ درجه سانتی گراد سانتریفیوژ کرده و مایع زرد رویی حاوی سرم را با دقت جدا کنید. نمونه را روی یخ نگهدارید. جهت نگهداری طولانی مدت، سرم را در دمای منفی ۸۰ درجه قرار دهید که در این صورت ماندگاری نمونه ۱ ماه خواهد بود.

(۲) آماده‌سازی محلول کار:

- **Assay Buffer 10X:** یک میلی‌لیتر از بافر را با ۹ میلی‌لیتر آب دیونیزه مخلوط و از رسیدن محلول به pH=7 اطمینان حاصل کنید (نوند سلامت استفاده از HCl و NaOH را برای تنظیم pH توصیه می‌کند).
- **Sample Buffer 10X:** یک میلی‌لیتر از بافر را با ۹ میلی‌لیتر آب دیونیزه مخلوط و پس از کنترل pH=7 به عنوان بافر نمونه برای رقیق کردن، استفاده نمائید (نوند سلامت استفاده از HCl و NaOH را برای تنظیم pH توصیه می‌کند).
- **Lysis Buffer 10X:** یک میلی‌لیتر از بافر را با ۹ میلی‌لیتر آب دیونیزه مخلوط و پس از کنترل pH=7 به عنوان بافر نمونه استفاده کنید (نوند سلامت استفاده از HCl و NaOH را برای تنظیم pH توصیه می‌کند).
- **Reagent 2:** ۷۰ میکرولیتر از R2 را با ۹/۹۳ 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.
- **Standard:** هنگام استفاده طبق روش آماده‌سازی استاندارد تهیه شود.
- **Reagent 5:** لطفاً قبل از استفاده از معرف، آن را داخل بن ماری گرم کنید و قبل از استفاده ورنکس نمائید.
- سایر معرف‌ها نیاز به آماده‌سازی ندارند.

(۳) روش کار:

A. ۱۰۰ میکرولیتر از Assay Buffer رقیق شده را با ۳۰ میکرولیتر R1 به چاهک‌های میکروپلیت اضافه و شیک کنید، در ادامه ۲۰ میکرولیتر از نمونه‌های بیولوژیکی (که شامل سرم، پلاسما، لیز سلول و بافت هموژن‌شده می‌باشد) و یا استاندارد با غلظت‌های مختلف، را به چاهک اضافه نمائید. برای شروع واکنش، ۲۰ میکرولیتر از R2 آماده شده را به چاهک‌ها اضافه پس از شیک کردن، پلیت 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).



B. در ادامه، ۳۰ میکرولیتر از R3 را برای خاتمه واکنش اضافه و پس از مخلوط کردن، ۳۰ میکرولیتر از R4 (کروموژن) به لوله‌ها اضافه نموده و مخلوط نمائید.

C. 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).

D. پس از ۱۰ دقیقه انکوباسیون، ۱۰ میکرولیتر از R5 را اضافه و با میکروپلیت‌ریدر در طول موج 550 ± 20 نانومتر قرائت نمائید. توجه داشته باشید برای رسیدن به نتایج قابل اتکا می‌بایست میزان فعالیت آنزیم کاتالاز در نمونه‌های شما مابین ۵ تا ۳۰ میکرومول فرمالدهید باشد. در غیر این صورت بهتر است نمونه‌ها را با Sample Buffer رقیق و ضریب رقت را در فرمول نهایی لحاظ کنید.

۴) رسم منحنی استاندارد:

برای رسم منحنی استاندارد، ۱۰ میکرولیتر از استاندارد موجود در کیت را با ۹/۹۹ میلی‌لیتر از Sample Buffer_{1x} مخلوط و با استفاده از جدول زیر رقیق نمائید:

لوله (چاهک)	استاندارد رقیق شده (میکرولیتر)	Sample Buffer (میکرولیتر)	غلظت نهایی استاندارد (μM)
A	۰	۱۰۰۰	۰
B	۱۰	۹۹۰	۵
C	۳۰	۹۷۰	۱۵
D	۶۰	۹۴۰	۳۰
E	۹۰	۹۱۰	۴۵
F	۱۲۰	۸۸۰	۶۰
G	۱۵۰	۸۵۰	۷۵

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 نمودار خط را با یکی از نرم‌افزارهای آماری همانند اکسل ترسیم و از فرمول خط و ضریب رگرسیون برای محاسبه میزان فعالیت آنزیم کاتالاز استفاده نمائید.

۵) محاسبات:

با استفاده از نرم‌افزارهای آماری مثل اکسل، نمودار استاندارد (فرمالدهید) را با توجه به اعداد بدست آمده از جدول استانداردها رسم نمائید. فرمول خط حاصل به شکل زیر خواهد بود:

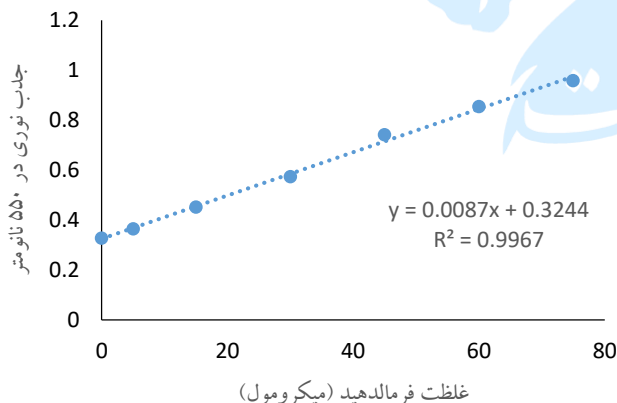
$$y = Ax + B$$

y: جذب نوری استاندارد

A: شیب خط (مثال در فرمول نمودار بالا این عدد برابر با ۰/۰۰۸۷ می‌باشد)

x: غلظت فرمالدهید

B: عرض از مبدا (مثال در فرمول نمودار بالا این عدد برابر با ۰/۳۲۴۴ می‌باشد)



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

$$\text{Formaldehyde } (\mu\text{M}) = \frac{\text{OD Sample} - B}{A} \times \frac{0.17\text{ml}}{0.02\text{ml}}$$

$$\text{Catalase Activity} = \frac{\text{Sample } (\mu\text{M})}{20 \text{ min}}$$

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



۶) توصیه‌ها:

- محتویات کیت در یخچال (دمای ۲-۸ درجه سانتی‌گراد) نگهداری شود و 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.
- ممکن است یک پژوهشگر نتایج متفاوت از آزمایش مشابه به دست بیاورد. توصیه می‌شود از هر نمونه ۳ بار تکرار انجام دهید و میانگین آن‌ها را به عنوان نتیجه نهایی در نظر بگیرید. همچنین برای رسم منحنی حتماً از ۳ بار تکرار در غلظت‌های مختلف لحاظ شده و میانگین را به عنوان 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.
- هرگونه تغییر در مخلوط کردن، زمان یا دمای انکوبه و زمان مصرف کیت نتایج مختلفی را ارائه خواهد داد لذا توصیه می‌شود در تغییر هر یک از پارامترها، منحنی استاندارد جدیدی رسم شود.
- قبل از شروع آزمایش، از کافی بودن مقدار نمونه‌ها اطمینان حاصل کنید.
- کیت‌های مختلف ممکن است حساسیت، محدوده تشخیص و روش کار متفاوتی داشته باشند، لذا آزمایش را دقیقاً طبق روش کار مندرج در این پروتکل انجام دهید.
- محلول و مواد دیگر را جایگزین محلول و مواد داخل کیت نکرده و تنها از مواد موجود در کیت استفاده کنید.
- پس از شروع آزمایش، تمام مراحل باید بدون وقفه کامل شود. اطمینان حاصل کنید که همه معرف‌ها، مواد و دستگاه‌ها در زمان مناسب آماده می‌شوند.
- زمان انکوباسیون نتایج را تحت تأثیر قرار خواهد داد لذا همه چاهک‌ها باید در همان ترتیب و زمان، مورد استفاده قرار گیرند.
- در زمان کار با کیت رعایت اصول ایمنی آزمایشگاهی الزامی می‌باشد.

۷) عیب‌یابی:

مشکل	احتمالات موجود	راه حل‌های 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	آماده‌سازی نمونه‌ها با بافر نادرست	از بافر موجود در کیت استفاده نموده و یا به دستورالعمل موجود در پروتکل مراجعه نمایید
	نمونه‌های کشت بافت/سلول به صورت کامل هموژن نشده	هموژن کردن نمونه را تکرار نموده و مدت زمان مرحله‌ی همگن‌سازی را افزایش دهید
	استفاده از نمونه‌های چند بار دفریز شده	اگر نمونه‌ها چندین بار مورد استفاده قرار خواهند گرفت نمونه‌ها را در هنگام نمونه‌برداری به دو یا سه قسمت تقسیم نموده و فریز نمایید
	وجود ماده‌ی مداخله‌گر در نمونه	در صورت امکان نمونه را بیشتر رقیق نمایید
خوانش بالا و یا پایین در نمونه‌ها و استاندارد	استفاده از نمونه‌های قدیمی یا نامناسب	ترجیحاً از نمونه‌های تازه استفاده کنید
	دمای نامناسب ترکیبات	اجازه دهید تمام ترکیبات به دمای اتاق رسید، سپس به آرامی ترکیب نمایید
	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	محلول کار را قبل از استفاده آماده کنید
منحنی استاندارد غیر خطی (با ضریب رگرسیون زیر ۰/۸)	زمان و درجه حرارت نامناسب انکوباسیون	به پروتکل مراجعه کرده و زمان و دمای مناسب انکوباسیون را بررسی نمایید
	استفاده از حجم‌های نامناسب	از سمپلر کالیبره شده استفاده نمایید
	استفاده از ترکیبات نیمه گرم شده	قبل از آماده‌سازی محلول واکنش، همه اجزاء را به دمای مناسب رسانده سپس دوباره ترکیب نمایید
	خطاهای مرتبط با پیپت کردن در آماده‌سازی محلول‌های استاندارد	برای جلوگیری از خطا، از حجم‌های بالا استفاده نمایید
نتایج غیر منتظره	خطاهای مربوط به مخلوط کردن محلول واکنش	محلول کار را با استفاده از ورتکس کامل مخلوط نمایید
	تشکیل حباب‌های هوا در چاهک‌ها	محتویات پیپت را به آرامی در چاهک‌ها خالی نمایید
	غلظت محلول استاندارد نادرست است	به دستورالعمل آماده‌سازی رقت‌های استاندارد در پروتکل مراجعه کنید
	خطاهای محاسبات	بعد مراجعه به پروتکل، محاسبات را دوباره انجام دهید
نتایج غیر منتظره	نمونه‌ها در طول موج نادرست خوانده شوند	تنظیمات فیلتر و دستگاه را بررسی نمایید
	نمونه‌ها دارای محتویات مداخله‌گر باشند	در صورت امکان نمونه را بیشتر رقیق نمایید
	خواندن نمونه در بالا و یا زیر محدوده خطی	نمونه‌های غلیظ یا رقیق کرده تا خوانایی آن‌ها در محدوده خطی قرار گیرد

- در صورتی که در انجام هر یک از مراحل آزمایش دچار ابهام، مشکل یا اشتباه شده‌اید، نگران نباشید، تیم پشتیبانی فنی نوند سلامت در کنار شماست. کافی است به شماره تلفن ۰۹۰۱۴۱۱۴۰۹۷ از طریق واتساپ/تلگرام پیام دهید. کارشناسان ما برای رفع مشکل با شما تماس خواهند گرفت.
- نظرات و پیشنهادات مشتریان، همواره پله‌های پیشرفت و بهبود کیفیت را در نوند سلامت تشکیل می‌دهند. لذا در صورت وجود هرگونه نظر، انتقاد یا پیشنهاد، لطفاً آن را از طریق ایمیل hi@navandsalamat.com یا ما در میان بگذارید.