



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 اکسیدکننده 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 غریب‌پستانداران 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 هموژنه و لیزات سلولی استفاده می‌شود.

محتوای کیت:

ردیف	دمای نگهداری	نام ماده	۴۸ تست	۹۶ تست	۱۹۲ تست
۱	2-8 °C	Reagent 1	۲/۵ میلی‌لیتر	۵ میلی‌لیتر	۱۰ میلی‌لیتر
۲	2-8 °C	Reagent 2	۵۰۰ میکرولیتر	۵۰۰ میکرولیتر	۵۰۰ میکرولیتر
۳	2-8 °C	Reagent 3	۲/۵ میلی‌لیتر	۵ میلی‌لیتر	۱۰ میلی‌لیتر
۴	2-8 °C	Reagent 4	۵ میلی‌لیتر	۱۰ میلی‌لیتر	۲۰ میلی‌لیتر
۵	2-8 °C	Reagent 5	۲/۵ میلی‌لیتر	۵ میلی‌لیتر	۱۰ میلی‌لیتر
۶	2-8 °C	Sample Buffer	۲/۵ میلی‌لیتر	۵ میلی‌لیتر	۱۰ میلی‌لیتر
۷	2-8 °C	Assay Buffer	۷۵۰ میکرولیتر	۱/۵ میلی‌لیتر	۳ میلی‌لیتر
۸	2-8 °C	Standard solution	۵۰۰ میکرولیتر	۵۰۰ میکرولیتر	۵۰۰ میکرولیتر
۹	2-8 °C	Lysing Buffer	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)
- سانتریفوز



مراحل انجام آزمایش:

۱) آماده سازی نمونه ها:

نمونه های بافتی: برای لیز نمونه های 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 هموژن نمائید. سپس در ۸۰۰۰ دور به مدت ۱۰ دقیقه سانتریفیوژ (نوند سلامت در این مرحله استفاده از سانتریفیوژ یخچالدار را توصیه می کند) کرده و برای انجام آزمایش از مایع رویی به عنوان نمونه استفاده نمائید (توجه داشته باشید که مایع رویی تا زمان استفاده باید در کنار یخ و یا در یخچال نگهداری شود).

نمونه های سلولی: برای اندازه گیری کاتالاز در سلول، ۱۰^۶ سلول در یک میلی لیتر بافر لیزکننده هموژنایز 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 سلول ها از کف پلیت، از مواد پروتئولیتیک (مانند تریپسین) استفاده نکنید.

نمونه های پلاسما و لیزات اریتروسیت: خون را با استفاده از مواد ضد انعقاد مانند هپارین، سیترات 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. لایه سفید زیرین که حاوی لوکوسیت است را جدا و دور بریزید. لایه آخرین که حاوی اریتروسیت است را ۴ مرتبه با حجم مساوی آب مقطر لیز کنید. در ۱۰۰۰۰ دور در دقیقه به مدت ۱۵ دقیقه سانتریفیوژ کنید. مایع رویی که حاوی اریتروسیت است را جهت سنجش روی یخ نگهدارید. جهت نگهداری طولانی مدت، اریتروسیت را در دمای منفی ۸۰ درجه قرار دهید که در این صورت ماندگاری نمونه ۱ ماه خواهد بود.

نمونه های 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) آماده سازی محلول کار:

- **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 می کند).
- **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 نمائید (نوند سلامت استفاده از NaOH را برای تنظیم pH توصیه می کند).
- **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 می کند).
- **Reagent2:** ۷۰ میکرو لیتر 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 می شود که در زمان شروع آزمایش تهیه شود.
- سایر معرف ها نیاز به آماده سازی ندارند.

۳) روش کار:

A. ۵۰ میکرو لیتر از Assay Buffer را با ۵۰ میکرو لیتر R1 مخلوط و سپس ۱۰ میکرو لیتر از R2 آماده شده را به مخلوط اضافه کرده و در ادامه برای شروع واکنش، ۱۰۰ میکرو لیتر از نمونه های بیولوژیکی (که شامل سرم، پلاسما، لیز سلول و بافت هموژن شده می باشد) و یا استاندارد با غلظت های مختلف را به مخلوط اضافه نمائید. لوله ها 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، 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.
- 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، ۵۰ میکرولیتر از R5 را اضافه و پس از مخلوط کردن، در ۴۰۰۰ دور به مدت ۵ دقیقه سانتریفیوژ نمائید.
- E. مقدار ۲۰۰ میکرولیتر از هر لوله را به چاهک‌های پلیت ۹۶ خانه اضافه نموده و با میکروپلیت‌ریدر در طول موج ۵۵۰±۲۰ 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 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.

۴) رسم منحنی استاندارد:

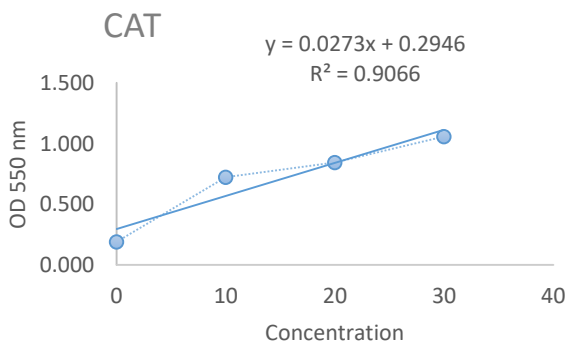
برای رسم منحنی استاندارد، استاندارد موجود در کیت را با استفاده از جدول زیر رقیق نمائید:

لوله (چاهک)	استاندارد (میکرولیتر)	Sample Buffer (میکرولیتر)	غلظت نهایی (μM) استاندارد
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.

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 ۰/۰۲۷۳ می‌باشد)

x: غلظت فرمالدهید

B: عرض از مبدا (مثال در فرمول نمودار بالا این عدد برابر با ۰/۲۹۴۶ می‌باشد)

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

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

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

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 استانداردها	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
	زمان و درجه حرارت نامناسب انکوباسیون	به پروتکل مراجعه کرده و زمان و دمای مناسب انکوباسیون را بررسی نمایید
منحنی استاندارد غیر خطی (با ضریب رگرسیون زیر ۰/۸)	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
	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
نتایج غیر منتظره	خطاهای محاسبات	بعد مراجعه به پروتکل، محاسبات را دوباره انجام دهید
	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 با ما در میان بگذارید.