

کیت سنجش فعالیت آنزیم کاتالاز

(Catalase Assay Kit)

(Cat-No: SK1193)

الف) مقدمه

آنزیم کاتالاز (EC 1.11.1.6; $2H_2O_2$ oxidoreductase) یک آنتی اکسیدانت آنزیمی است که در اکثر سلولهای هوازی وجود دارد. این آنزیم مسئول تجزیه پراکسید هیدروژن، گونه فعال اکسیژنی که محصول متابولیسم طبیعی سلول و فرایندهای پاتوزنی می باشد، به اکسیژن ملکولی و دو ملکول آب می باشد. علاوه بر این، این آنزیم فعالیت پراکسیدازی نیز دارد که در آن از الکل هایی با وزن ملکولی پایین میتواند به عنوان دهنده الکترون استفاده کند. از اینرو، الکل های آلیفاتیک به عنوان سوبسترای ویژه آنزیم کاتالاز عمل می کنند در حالیکه سایر آنزیم های پراکسیدازی نمی توانند از این سوبستراها استفاده کنند.

ب) اساس سنجش کیت

در کیت سنجش فعالیت کاتالاز شرکت آرسام فرا زیست از عملکرد پراکسیدازی کاتالاز برای تعیین فعالیت آنزیم استفاده می شود. این روش بر پایه واکنش آنزیم با متانول در غلظت مناسبی از پراکسید هیدروژن می باشد. فرمالدهید تولید شده در این واکنش با روش رنگ سنجی اندازه گیری می شود. معرف کروموژن (پرپالد) با فرمالدهید، حلقه هتروسیکل را تشکیل می دهد که طی اکسیداسیون از حالت بیرنگ به رنگ بنفش تغییر می یابد.

این کیت را می توان برای اندازه گیری فعالیت کاتالاز در نمونه های پلاسما، سرم، لیزات گلبول قرمز، بافت و سلول به کار برد.

میزان حساسیت کیت موجود: ۲ U

ج) محتویات کیت

ردیف	نام ماده	حجم	توضیحات
۱	بافر فسفات (PBS)	100 ml	
۲	بافر لیز (Lysis Buffer)	50 ml	
۳	بافر واکنش (Reaction buffer)	50 ml	
۴	محلول های استاندارد ۱ تا ۶	5x1 ml	
۵	پتاسیم پریدات (KIO_4)	20 ml	با احتیاط مصرف شود
۶	حلال معرف (Chromogen solvent)	18 ml	با احتیاط مصرف شود. سوزش آور است.
۷	معرف کروموژن (Chromogen Reagent)	90 mg	محتویات معرف را در ۱۸ میلی لیتر حلال معرف حل نموده و پس از حل کردن، الیکوت نموده و در $20^{\circ}C$ نگهداری نمایید.
۸	پراکسید هیدروژن غلیظ (H_2O_2)	1 ml	۳۶ میکرولیتر از محلول پراکسید هیدروژن غلیظ را با ۹۶۴ میکرولیتر بافر نمونه مخلوط نمایید. سپس جهت تهیه استوک کاری پراکسید هیدروژن، ۱۰ میکرولیتر از آن را در یک میکروتیوب ریخته و با ۹۹۰ میکرولیتر بافر نمونه مخلوط نمایید. این محلول بایستی قبل از استفاده تهیه گردد.
۹	متانول (Methanol)	20 ml	
۱۰	هیدروکسید پتاسیم (KOH)	20 ml	



(د) نگهداری کیت

تمامی محتویات کیت بجز معرف کروموژن در 4°C نگهداری شود. معرف کروموژن در 20°C نگهداری شود.

(ه) آماده‌سازی نمونه

برای سنجش فعالیت کاتالاز نمونه‌های سلولی و بافتی باید قبل از سنجش هموژنیزاسیون انجام شود. اما نمونه‌های سرمی، پلاسمایی و یا مایعات بدن را می‌توان بعد از تعیین غلظت پروتئین مستقیماً برای سنجش به کار برد.

۱- تهیه لیزات سلولی

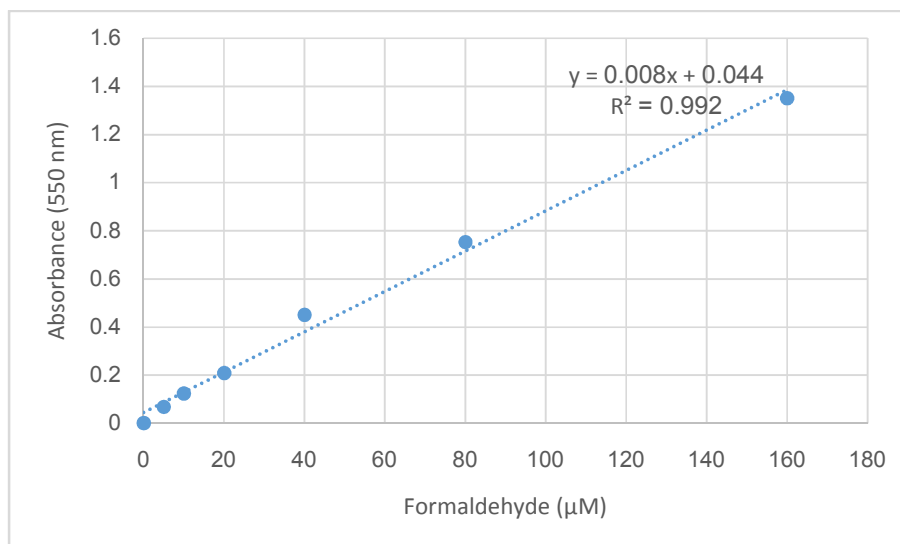
10^6 سلول را جمع آوری کرده و با PBS شسته و بعد از حذف آن، پلت سلولی را در 80°C تا زمان استفاده نگهداری کنید. برای تهیه لیزات سلولی $100-50\ \mu\text{L}$ از بافر لیز را به پلت سلولی اضافه نمایید و سلول‌ها را با پیپت کردن کاملاً حل کرده و به مدت ۳۰ دقیقه در روی یخ قرار دهید و هر ۱۰ دقیقه یکبار به مدت ۱۵ ثانیه ورتکس نمایید. سرانجام به مدت ۵ دقیقه با حداکثر دور (13000rpm) آن را سانتریفیوژ کرده و مایع رویی را برای سنجش فعالیت آنزیم کاتالاز جمع آوری کنید. مقداری از مایع رویی را برای تعیین غلظت پروتئینی آن توسط روش برادفورد یا لوری اختصاص دهید.

۲- تهیه هموژنات بافتی

بافت باید کاملاً با PBS شسته شود تا سلولهای خونی حذف شوند. 200mg از بافت را در یک میلی‌لیتر بافر لیز هموژن کرده و به مدت ۵ دقیقه در میکروسانتریفیوژ یخچال دار با سرعت حداکثر سانتریفیوژ کنید و مایع رویی را برای سنجش فعالیت آنزیم کاتالاز جمع آوری کنید. مقداری از مایع رویی را برای تعیین غلظت پروتئینی آن توسط روش برادفورد یا لوری اختصاص دهید.

(و) ترسیم نمودار استاندارد

برای رسم نمودار استاندارد مقدار 50 میکرولیتر از غلظت‌های معلوم استانداردهای موجود در کیت (10 تا 160 میکرومولار) برداشته و مطابق روش گفته شده در بخش زیر عمل شود. سپس مقدار جذب 550nm نمونه‌های استاندارد بر علیه غلظت-های معلوم به صورت زیر ترسیم شود.





ز- سنجش فعالیت آنزیمی نمونه

روش کار

۱. ۲۰۰ میکرولیتر بافر واکنش را با ۱۵۰ میکرولیتر متانول و ۳۰ میکرولیتر استوک کاری H_2O_2 (ردیف ۸ جدول محتویات کیت) در یک میکروتیوب ریخته و به آرامی تکان دهید.
۲. ۵۰ میکرولیتر نمونه / محلول استاندارد را به هر میکروتیوب اضافه نموده و پس از مخلوط کردن، به مدت ۲۰ دقیقه دور از نور انکوبه نمایید. برای نمونه شاهد، از ۵۰ میکرولیتر بافر واکنش استفاده نمایید.
۳. برای خاتمه واکنش، ۱۵۰ میکرولیتر محلول هیدروکسید پتاسیم را اضافه نمایید. سپس بلافاصله، ۱۵۰ میکرولیتر معرف کروموژن را به هر میکروتیوب افزوده و ورتکس نمایید.
۴. پس از ۱۰ دقیقه انکوباسیون، ۱۵۰ میکرولیتر پتاسیم پریdat را به نمونه ها افزوده و به مدت ۱۰ دقیقه در دور ۱۰۰۰۰ سانتیفریوژن نمایید.
۵. در نهایت جذب نمونه ها را در ۵۵۰ نانومتر با دستگاه اسپکتروفتومتر خوانش نمایید.

نکته: مقادیر ذکر شده در فوق برای روش لوله آزمایش و خوانش با اسپکتروفتومتر می باشد. در صورتیکه از الایزا ریدر استفاده می شود مقادیر فوق به نسبت یکسان کم شود (یک چهارم مقادیر فوق استفاده شود).

ح) محاسبه

ابتدا، غلظت فرمالدهید تشکیل شده در نمونه ها را بر حسب میکرومولار با استفاده از معادله خط نمودار استاندارد محاسبه نمایید. با جایگزینی عدد جذب بدست آمده به جای Y در معادله خط نمودار استاندارد، X (غلظت فرمالدهید) به دست می آید. در نهایت، فعالیت آنزیمه کمک معادله زیر بر حسب U بدست می آید.

U: هر واحد آنزیمی به مقدار آنزیمی گفته می شود که تشکیل یک نانومول فرمالدهید را در یک دقیقه کاتالیز نماید.

از آنجایی که در روش کار کیت حاضر $50 \mu\text{M}$ نمونه استفاده شده است و حجم واکنش ۴۳۰ میکرولیتر می باشد ضریب رقت در این کیت ۸/۶ می باشد.

نکته: چنانچه لازم باشد فعالیت آنزیم نسبت به پروتئین کل نمونه، نرمال سازی شود کافی است عدد بدست آمده در فوق به غلظت پروتئین کل نمونه تقسیم و بر حسب یک واحد آنزیمی بر میلی گرم پروتئین (U/mg) بیان شود.