

کیت سنجش فعالیت آنزیم‌های پلی فنول اکسیداز (PPO) و پراکسیداز (POX)

PPO and POX Assay Kit CN. KPG-PPOX

آنزیم‌های پلی فنول اکسیداز (PPO) و پراکسیداز (POX) از آنزیم‌های کلیدی در متابولیسم ثانویه گیاهان هستند که نقش اساسی در پاسخ به تنش‌های زیستی و غیرزیستی ایفا می‌کنند. PPO با کاتالیز اکسیداسیون ترکیبات فنولی به کینون‌ها مسئول قهوه‌ای شدن آنزیمی در میوه‌ها و سبزیجات است و نقش مهمی در دفاع گیاه در برابر پاتوژن‌ها ایفا می‌کند و همچنین در کیفیت محصولات غذایی مانند چای، قهوه، و شکلات بسیار مؤثر است. از طرفی آنزیم POX با استفاده از پراکسید هیدروژن به عنوان کوسوبسترا در سنتز لیگنین مشارکت کرده و نقش مهمی در سم‌زدایی گونه‌های فعال اکسیژن ایفا می‌کند و به عنوان یک نشانگر بیولوژیک برای تنش‌های محیطی در صنعت غذایی کاربرد دارد. این کیت با طراحی منحصر به فرد امکان سنجش همزمان و دقیق فعالیت هر دو آنزیم را در نمونه‌های گیاهی، غذایی و بیولوژیکی با حساسیت بالا فراهم می‌کند. سنجش فعالیت این آنزیم‌ها در این کیت بر اساس تغییرات جذب نوری در واحد زمان محاسبه می‌شود.

پارامترهای اعتبارسنجی:

محدوده خطی: $U/mL \ 4000-0.01$ حد تشخیص: $U/mL \ 0.1$
دقت درون آزمایشی: $CV < 3\%$ دقت برون آزمایشی: $CV < 8\%$

محتویات کیت:

۱. بافر رقیق کننده A (Diluent Reagent A) (KPG-PPOXPBS0/17)
۲. بافر رقیق کننده B (Diluent Reagent B) (KPG-PPOXSODC)
۳. سوبسترا A (Substrate A) (KPG-PPOXH2)
۴. سوبسترا B (Substrate B) (KPG-PPOXPYR)
۵. بافر مهارکننده (Inhibitory buffer) (KPG-PPOXNAN)
۶. بافر متوقف کننده (Stopping Buffer) (KPG-PPOXSTP)
۷. پلیت الایزا

موارد مورد نیاز که در کیت موجود نیست: سمپلر و سر سمپلر، الایزا ریدر حاوی طول موج ۴۱۲ نانومتر

آماده سازی محلول‌ها:

- برای آماده سازی سوبسترا A، در کیت ۹۶ تستی به میزان ۱۱ میکرولیتر (در کیت ۴۸ تستی ۵/۵ میکرولیتر) از محتویات سوبسترا A را با ۱۰ میلی لیتر (در کیت ۴۸ تستی ۵ میلی لیتر) از بافر رقیق کننده A در ظرفی جداگانه با یکدیگر مخلوط کنید.
- برای آماده سازی سوبسترا B در کیت ۹۶ تستی به میزان ۱۰ میلی لیتر (در کیت ۴۸ تستی ۵ میلی لیتر) بافر رقیق کننده B به ظرف سوبسترا B اضافه کرده و به خوبی مخلوط کنید.
- برای آماده سازی بافر مهار کننده در کیت ۹۶ تستی به میزان ۱۰ میلی لیتر (در کیت ۴۸ تستی ۵ میلی لیتر) از بافر رقیق کننده A به ظرف بافر مهارکننده اضافه کرده و به خوبی مخلوط کنید.

تمامی محلول‌ها بعد از آماده سازی ۷۲ ساعت در تاریکی و در دمای ۴ درجه سانتیگراد پایدار هستند. دقت نمایید محلول‌ها تا زمانی که به صورت پودر هستند در دمای محیط و به مدت یک سال پایدار می‌باشند.

آماده سازی نمونه: برای آماده سازی نمونه گیاه، ابتدا ۵۰ میلی گرم از بافت را در ۱۰۰۰ میکرولیتر بافر رقیق کننده A کاملاً هموزن کرده (این عمل در دمای سرد انجام شود، به طورمثال بافر رقیق کننده را با انکوبه یک ساعته در یخچال سرد کنید) و سپس در دور RPM ۱۰۰۰۰ به مدت ۱۰ دقیقه سانتریفیوژ کرده و در نهایت مایع رویی را برای انجام تست استفاده کنید.

روش انجام تست:

۱. قبل از شروع آزمایش مطمئن شوید تمام محلول‌ها دارای دمای محیطی باشند.
۲. برای هر نمونه دو چاهک باید در نظر بگیرید، یکی برای تست PPO و دیگری برای تست PPO + POX. برای بلانک نیز یک چاهک در نظر بگیرید و مطابق جدول زیر از بافر های مناسب به هر چاهک اضافه کنید.

چاهک	بافر رقیق کننده	نمونه	بافر مهار کننده	سوبسترا A	عملکرد
بلانک	80 µL	-	5 µL	50 µL	حذف رنگ زمینه ای
PPO	110 µL	20 µL	5 µL	-	سنجش عملکرد PPO
PPO + POX	65 µL	20 µL	-	50 µL	سنجش عملکرد همزمان PPO و POX

۳. بعد از مخلوط کردن محتوای چاهک‌ها، در دمای محیطی و در تاریکی به مدت ۵ دقیقه انکوبه کنید.

۴. به تمامی چاهک‌ها ۵۰ میکرولیتر از سوبسترا B اضافه کرده و به مدت ۵ دقیقه در دمای محیط انکوبه کنید.

۵. ۵۰ میکرولیتر از بافر متوقف کننده اضافه کرده و بلافاصله در طول موج ۴۱۲ نانومتر خوانش نمایید.

۶. محاسبات: برای محاسبه فعالیت PPO و POX از فرمول‌های زیر استفاده کنید:

$$\text{فعالیت PPO (U/mL)} = \frac{(A \text{ Test} - A \text{ Blank}) \times df \times Vt}{\epsilon \times d \times Vs \times t}$$

در این فرمول A Blank مربوط به بلانک و A Test مربوط به PPO و PPO+POX، df ضریب رقت است (با توجه به هموزن شدن ۵۰ میلی گرم در ۱۰۰۰ میکرولیتر بافر، این رقت عدد ۲۰ است)، Vt مربوط به حجم کل که در این کیت ۰/۲۳۵ است، ε ضریب خاموشی سوبسترا که معادل $CM^{-1} \ 2447 M^{-1}$ می‌باشد، d مربوط به مسافت مسیر نور که در اینجا ۱ می‌باشد، Vs مربوط به حجم نمونه که معادل ۰/۰۲ و t مربوط به زمان واکنش است که باید ۵ (دقیقه) در نظر گرفته شود. با اعمال عددهای فوق فرمول به صورت زیر ساده می‌شود:

$$\text{فعالیت PPO (U/mL)} = (A \text{ Test} - A \text{ Blank}) \times 19$$

فعالیت همزمان PPO و POX (PPO+POX) نیز با استفاده از همین فرمول محاسبه می‌شود و در نهایت برای محاسبه میزان فعالیت POX به تنهایی، بایستی میزان فعالیت همزمان (PPO+POX) را از میزان فعالیت PPO کسر کنید.

برای محاسبه فعالیت آنزیم‌ها در واحد گرم (Gram)، فعالیت آنزیم را در عدد ۲۰ ضرب کنید زیرا در ابتدا ۵۰ میلی گرم از بافت گیاه مورد استفاده شده و بنابراین با ضرب در عدد ۲۰، داده به صورت U/g گزارش می‌شود.

در صورتیکه پروتئین توتال را نیز اندازه گیری کرده اید (پیشنهاد ما استفاده از کیت اندازه گیری توتال پروتئین کارمانیا پارس ژن است)، از فرمول زیر برای نرمال کردن داده‌ها استفاده کنید:

$$\text{فعالیت PPO (U/mg)} = \frac{\text{فعالیت PPO (U/mL)}}{\text{تام پروتئین غلظت (mg/mL)}}$$

$$\text{فعالیت PPO (U/mg)} = \frac{\text{فعالیت PPO (U/mL)}}{\text{تام پروتئین غلظت (mg/mL)}}$$

دستورالعمل های ایمنی: محلول‌های مورد استفاده در این کیت برای بافت انسان خطرناک هستند، از این رو، در موارد تماس با پوست، چشم و غیره، با آب شسته و برای درمان اضافی به بیمارستان مراجعه کنید.

کیت های مشابه در حیطه اکسیدان ها و آنتی اکسیدان ها تولیدی کارمانیا پارس ژن:

۱. کیت بررسی فعالیت تام آنتی اکسیدانی (FRAP)
۲. کیت بررسی فعالیت کاتالاز
۳. کیت بررسی فعالیت MDA
۴. کیت بررسی میزان NO
۵. کیت بررسی فعالیت پاراکسوناز-۱
۶. کیت بررسی میزان استیل کولین استراز
۷. کیت بررسی میزان استیل کولین
۸. کیت بررسی فعالیت SOD
۹. کیت اندازه گیری توتال پروتئین
۱۰. کیت بررسی فعالیت میلوپراکسیداز
۱۱. کیت سنجش مقادیر ROS
۱۲. کیت سنجش فعالیت همزمان ROS و میلوپراکسیداز
۱۳. کیت سنجش فعالیت GPX
۱۴. کیت سنجش فعالیت پراکسیدوکسین ها
۱۵. کیت سنجش فعالیت پراکسیداز شیر
۱۶. کیت سنجش فعالیت آلکالین فسفاتاز شیر
۱۷. کیت سنجش میزان GSSG (گلوتاتیون اکسید شده)
۱۸. کیت سنجش میزان واحدهای تیول آزاد (گلوتاتیون احیا)
۱۹. کیت سنجش فعالیت آرژیناز
۲۰. کیت سنجش وضعیت آنتی اکسیدان ها با روش DPPH
۲۱. کیت سنجش میزان کربونیل پروتئین پراکسیداز شیر
۲۲. کیت سنجش میزان توتال اکسیدان ها (TOS)

کارمانیا پارس ژن تولید کننده کیت های:

۱. الایزا برای اندازه گیری سایتوکین ها
۲. استخراج DNA و RNA به روش های ستونی، رسوبی و نانوذرات مگنت
۳. اندازه گیری miRNA
۴. محصولات مرتبط با کشت سلول مانند FBS، محیط کشت و سلول های سرطانی و بنیادی مزانشیمال
۵. میکروتیوب ها دستگاه های Real-Time PCR
۶. ستون های تخلیص DNA و RNA
۷. سرمپلر های ۱۰ سانتی متری با و بدون فیلتر

در صورت داشتن سول فنی با ما در تماس باشید

WWW.KARMANIAPARSGEN.IR ۰۹۱۳۲۹۶۱۱۳