

کیت اندازه گیری فعالیت کاتالاز Catalase Activity Assay Kit Catalog Nos. KPG-CAT

- محتویات کیت:
۱. محلول A (CN. KPG-CATa): ۲ عدد
 ۲. محلول B (CN. KPG-CATb)
 ۳. محلول C (CN. KPG-CATc)
- موارد مورد نیاز که در کیت موجود نیست: ۱. سمپلر و سر سمپلر، ۲. سانتریفیوژ، ۳. الایزا ریدر حاوی طول موج ۵۷۰ نانومتر

آماده سازی محلول ها:

➤ برای آماده سازی محلول A در کیت ۹۶ تستی ۲۵ میلی لیتر (در کیت ۴۸ تستی به میزان ۱۲/۵ میلی لیتر) آب مقطر به هر ویال اضافه کنید. دقت نمایید به دلیل عدم پایداری بلند مدت محلول A بعد از اضافه شدن آب مقطر، دو ظرف در کیت فراهم شده تا امکان استفاده برای دو مرتبه فراهم شود. بنابراین در صورت نیاز محلول A را آماده کنید.

آماده سازی محلول کار:

➤ محلول A آماده شده را به نسبت ۱ به ۳ با اسید استیک و به میزان مورد نیاز مخلوط کنید. به طور مثال = ۱۰۰ میکرولیتر از محلول A با ۳۰۰ میکرولیتر اسید استیک. (محلول A مخلوط با اسید تهیه شده به مدت ۷۲ ساعت و در مکان تاریک پایدار می باشد).

➤ محلول B و C باید قبل از آزمایش مخلوط شوند. بر این اساس، آنها را در نسبت های ۱/۲۰۰ مخلوط کنید. به عنوان مثال، اگر نیاز به آزمایش ۴ نمونه دارید، ۹۹۵ میکرولیتر محلول B را با ۵ میکرولیتر محلول C مخلوط کنید. (مخلوط فقط به مدت ۴۸ ساعت پایدار است و باید بلافاصله قبل از آزمایش آماده شود). خود محلول ها در صورتیکه مخلوط نباشند (فرمی که در کیت موجود است) به مدت ۱ سال پایدار می باشند.

آماده سازی نمونه: اگر از سرم، پلاسما یا ادرار استفاده میکنید نیازی به رقیق سازی نمونه نیست. در مواردی که نمونه بافت می باشد، ابتدا ۵۰ میلی گرم از بافت را در ۵۰۰ میکرولیتر بافر رقیق کننده نمونه کاملاً هموژن کرده (این عمل در دمای سرد انجام شود، به طور مثال بافر رقیق کننده را با انکوبه یک ساعته در یخچال سرد کنید) و سپس در دور RPM ۵۰۰۰ به مدت ۵ دقیقه سانتریفیوژ کرده و در نهایت مایع رویی را برای انجام تست استفاده کنید. از نمونه سوپرناتانت کشت سلول به دلیل داشتن معرف های رنگی حساس به Ph استفاده نکنید بلکه نمونه سلول را بایستی ابتدا از محیط جمع آوری کرد سپس با PBS شستشو داد و سپس در بافر رپا مخصوص تست های استرس اکسیداتیو (میتوانید از کارمانیا پارس ژن تهیه کنید) با دستگاه سونیکاتور کاملاً لیز کرده و لیزات سلول را سانتریفیوژ کرده و از سوپرناتانت برای تست استفاده کنید. دقت نمایید، در صورتیکه دستگاه سونیکاتور ندارید، نمونه سلول غوطه ور شده در بافر رپا را به تعداد ۱۰ مرتبه فریز و ذوب کنید و در هر بار به شدت مخلوط کنید.

روش انجام تست:

۱. قبل از شروع آزمایش، اجزای کیت را به مدت ۲۰ دقیقه در دمای اتاق نگه دارید.

۲. مواد را طبق جدول زیر در میکروتیوب های ۱/۵ میلی لیتری اضافه کنید.

	Test	Negative Control	Standard	Blank
Sample	25 µL	25 µL	-	-
Distilled water	-	250 µL	25 µL	275 µL
Mix B and C solution	250 µL	-	250 µL	-

۳. لوله ها را به مدت ۳ دقیقه در دمای ۳۷ درجه سانتیگراد انکوبه و سپس به تمامی لوله ها به جز بلانک ۵۰۰ میکرولیتر از محلول A آماده شده را اضافه کنید.

۴. تمام لوله ها را به مدت ۱۰ دقیقه در دمای ۱۰۰ درجه سانتیگراد انکوبه کنید و سپس در دور ۲۵۰۰ به مدت ۵ دقیقه سانتریفیوژ کنید.

۵. ۲۰۰ میکرولیتر از مایع رویی را به چاهک های پلیت ELISA منتقل کنید و OD آن را در طول موج ۵۷۰ نانومتر ارزیابی کنید.

۶. برای محاسبه فعالیت کاتالاز از فرمول زیر استفاده کنید:

$$\text{Catalase Activity } \left(\frac{\text{KU}}{\text{L}} \right) = [S' - (S - M)] \times \frac{2.33}{T} \times \frac{Vt}{Vs}$$

S'=Absorbance of standard, S= Absorbance of Test,

M= Absorbance of negative control, VT=Total Volume and VS= Volume of sample

با توجه به اینکه حاصل تقسیم ۲/۳۳ بر ۳ عدد ۰/۷۶۷۶۶۶ می باشد و همچنین حاصل تقسیم حجم نهایی بر حجم نمونه عدد ۱۶ است و حاصل ضرب ۰/۷۶۷۶۶۶ بر ۱۶ عدد ۱۲/۲۸۲ می باشد، بنابراین از فرمول زیر استفاده کنید:

$$\text{Catalase activity (KU/L)} = [S' - (S - M)] \times 12.282$$

دقت نمایید هر چه فعالیت کاتالاز بیشتر باشد میزان رنگ به وجود آمده (سبز) نیز کمتر خواهد بود زیرا محلول C بیشتر مصرف شده و وارد واکنش با محلول A نمی شود.

به همین دلیل است که استاندارد که فاقد کاتالاز است با محلول A کاملاً واکنش می کند. بنابراین در مواردی که میزان رنگ نمونه نارنجی بماند و نمونه ها یکدست نارنجی شوند نشان از مصرف کامل محلول C و بالا بودن میزان کاتالاز در نمونه است. در این موارد نمونه را حداقل یک دوم رقیق کنید. پیشنهاد می شود قبل از انجام تمامی تست ها، یک نمونه را در رقت های مختلف تست کرده و سپس باقی نمونه ها در رقت مناسب (OD: 0.5-1)، آماده سازی شوند.

برای سهولت محاسبه داده ها، فایل ایکسل طراحی شده توسط کمپانی KPG را از بارکد زیر دانلود کنید:



دقت نمایید OD مربوط به استاندارد عددی در حدود ۰/۵ تا ۰/۸ می باشد. در صورتیکه این عدد کمتر بود به همان نسبت مقادیر برای مخلوط کردن محلول های B و C را تغییر دهید. به طور مثال در صورتیکه جذب به دست آمده برای استاندارد ۰/۲ باشد، این نسبت باید به صورت ۱/۵۰ شود. بنابراین پیشنهاد می شود ابتدا یک تست برای استاندارد گذاشته و در صورت به دست آوردن OD مناسب برای استاندارد، تست بر روی نمونه ها انجام گردد.

دستورالعمل های ایمنی: محلول های 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 SOD
۳. کیت بررسی فعالیت MDA
۴. کیت بررسی میزان NO
۵. کیت بررسی فعالیت پاراکسوناز-۱

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 ها
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. محصولات یکبار مصرف آزمایشگاهی مانند یورین باتل و ...

با ما در تماس باشید

۰۹۱۳۲۹۲۶۱۱۳

WWW.KARMANIAPARSGEN.IR
karmaniaparsgene@gmail.com



Catalase Activity Assay Kit

Catalog Nos. KPG-CAT

Kit components:

1. **Solution A** (CN. KPG-CATa): 2 vials
2. **Solution B** (CN. KPG-CATb)
3. **Solution C** (CN. KPG-CATc)

Required items that are not included in the kit:

1. Sampler and sampler head
2. Centrifuge
3. ELISA reader containing a wavelength of 593 nm

Preparation of solutions:

- To prepare solution A in the 96-test kit, add 25 ml (12.5 ml in the 48-test kit) of distilled water to each vial. Note that due to the long-term instability of solution A after the addition of distilled water, two containers are provided in the kit to allow for two uses. Therefore, prepare solution A if needed.

Preparation of working solution:

- Mix the prepared solution A with acetic acid in a ratio of 1 to 3 and in the required amount. For example = 100 microliters of solution A with 300 microliters of acetic acid. (Solution A mixed with the prepared acid is stable for 72 hours in a dark place).
- Solution B and C should be mixed before testing. Accordingly, mix them in the ratio of 200/1. For example, if you need to test 4 samples, mix 995 µL of solution B with 5 µL of solution C. (The mixture is stable for only 48 hours and should be prepared immediately before testing). The solutions themselves are stable for 1 year if not mixed (the form provided in the kit).

Sample Preparation:

If using serum, plasma, or urine, no sample dilution is required.

For tissue samples: First, thoroughly homogenize 50 mg of tissue in 500 µL of sample dilution buffer (perform this step at a cold temperature; for example, pre-cool the dilution buffer by incubating it in the refrigerator for one hour). Then centrifuge at 5000 RPM for 5 minutes, and finally use the supernatant for the test.

Do not use the supernatant from cell culture samples, as it contains pH-sensitive colored reagents. Instead, first collect the cell sample from the culture medium, wash it with PBS, then fully lyse the cells in RIPA buffer specifically designed for oxidative stress tests (available from Karmania Pars Gene) using a sonicator. Centrifuge the cell lysate and use the supernatant for the test.

Note: If you do not have a sonicator, freeze-thaw the cell sample submerged in RIPA buffer 10 times, vigorously mixing each time.

Test Procedure:

1. Before starting the test, keep the kit components at room temperature for 20 minutes.
2. Add the ingredients according to the table below into 1.5 ml microtubes.

	Test	Negative Control	Standard	Blank
Sample	25 µL	25 µL	-	-
Distilled water	-	250 µL	25 µL	275 µL
Mix B and C solution	250 µL	-	250 µL	-

3. Incubate the tubes for 3 minutes at 37°C and then add 500 µl of the prepared solution A to all tubes except the blank.
4. Incubate all tubes for 10 minutes at 100°C and then centrifuge at 2500 rpm for 5 minutes.
5. Transfer 200 µL of the supernatant to the wells of the ELISA plate and evaluate its OD at 570 nm.
6. Use the following formula to calculate the catalase activity:

$$\text{Catalase Activity } \left(\frac{\text{KU}}{\text{L}} \right) = [S' - (S - M)] \times \frac{2.33}{T} \times \frac{V_t}{V_s}$$

S'=Absorbance of standard, S= Absorbance of Test,

M= Absorbance of negative control, VT=Total Volume and VS= Volume of sample

Given that the result of dividing 2.33 by 3 is 0.7676666, and also the result of dividing the final volume by the sample volume is 16, and the result of multiplying 0.7676666 by 16 is 12.282, so use the following formula:
Catalase activity (KU/L)= [S'-(S-M)]× 12.282

Note that the higher the catalase activity, the less color (green) will be produced because more solution C is consumed and does not react with solution A. This is why the standard, which does not contain catalase, reacts completely with solution A. Therefore, in cases where the sample color remains orange and the samples become uniformly orange, it indicates that solution C has been completely consumed and the catalase level in the sample is high. In these cases, dilute the sample by at least half. It is recommended to test one sample at different dilutions before performing all tests and then prepare the remaining samples at the appropriate dilution (OD: 0.5-1).

For easier data calculation, please download the Excel file designed by KPG Company using the barcode below:



Note that the OD of the numerical standard is about 0.6 to 0.8. If this number is lower, change the values for mixing solutions B and C accordingly. For example, if the absorbance obtained for the standard is 0.3, this ratio should be 1.50. Therefore, it is recommended to first perform a test on the standard and, if a suitable OD is obtained for the standard, perform the test on the samples.

Safety Instructions: The solutions used in this kit are hazardous to human tissue, hence, in cases of contact with skin, eyes, etc., wash with water and go to hospital for additional treatment.

Similar kits in the field of oxidants and antioxidants produced by Karmania Pars Gene:

1. Total Antioxidant Activity (FRAP) Testing Kit
2. Total Antioxidant Activity (DPPH) Testing Kit
3. Total Antioxidant Activity (ABTS) Testing Kit
4. Total Antioxidant Activity (CUPRAC) Testing Kit
5. MDA Activity Testing Kit
6. NO Level Testing Kit
7. Paraonase-1 Activity Testing Kit
8. Protein Carbonyl Level Testing Kit
9. SOD Activity Testing Kit
10. Acetylcholinesterase Activity
9. ...

Other products:

1. ELISA for measuring cytokines
2. DNA and RNA extraction by column, sedimentation and magnetic nanoparticles methods
3. Measurement of miRNAs
4. Products related to cell culture such as FBS, culture medium and cancer and mesenchymal stem cells
4. Microtubes Real-Time PCR devices
5. DNA and RNA purification columns

Contact us

+989132926113

WWW.KARMANIAPARSGEN.IR

karmaniaparsgene@gmail.com