

کیت اندازه گیری فعالیت آنزیم تیروزیناز Tyrosinase activity assay Kit CN. KPG-Tyr

آنزیم تیروزیناز یک متالوآنزیم مس‌دار است که نقش محوری در مسیر بیوسنتز ملانین ایفا می‌کند. این آنزیم دو فعالیت کاتالیتیکی متمایز دارد: فعالیت مونوفنولازی که هیدروکسیلاسیون L-تیروزین به L-DOPA را کاتالیز می‌کند، و فعالیت دی‌فنولازی که اکسیداسیون L-DOPA به دوپاکینون را تسهیل می‌نماید. دوپاکینون حاصل، به‌طور خودبه‌خودی و بدون نیاز به آنزیم اضافی، تحت یک سری واکنش‌های درون‌مولکولی قرار گرفته و به ترکیب رنگی دوپاکروم تبدیل می‌شود. تشکیل این کروموفور پایدار، اساس سنجش کلریمتریک فعالیت تیروزیناز را تشکیل می‌دهد و شدت رنگ تولید شده با فعالیت آنزیم در نمونه نسبت مستقیم دارد. کیت حاضر با بهره‌گیری از یک سوبسترای اختصاصی، شرایط واکنش را به‌گونه‌ای فراهم می‌آورد که فعالیت آنزیم تیروزیناز موجود در نمونه کاربر، مستقیماً به تغییر رنگ قابل اندازه‌گیری در طول موج مشخص تبدیل شود. این طراحی به کاربر امکان می‌دهد تا با استفاده از تنها دو نقطه خوانش جذبی، فعالیت آنزیم را در نمونه‌های بیولوژیکی، عصاره‌های گیاهی یا محصولات صنعتی به‌سادگی و با تکرارپذیری بالا ارزیابی کند.

محتویات کیت:

۱. بافر رقیق کننده نمونه (Diluent Reagent) (KPG-THIOLPBSS0/18)
 ۲. سوبسترا تیروزیناز (Tyrosinase substrate) (KPG-TDPA)
 ۳. پلیت الایزا
- موارد مورد نیاز که در کیت موجود نیست: سمپلر و سر سمپلر، ۲. الایزا ریدر حاوی طول موج ۴۷۰ نانومتر

آماده سازی محلول ها: بافر رقیق کننده نمونه آماده به کار است و نیازی به آماده سازی ندارد. برای آماده سازی سوبسترا تیروزیناز، در کیت ۹۶ تستی به میزان ۵ میلی لیتر (در کیت ۴۸ تستی ۲/۵ میلی لیتر) از بافر رقیق کننده نمونه به هر ظرف سوبسترا تیروزیناز اضافه کرده و به خوبی مخلوط کنید. دقت کنید برای حل شدن کامل به مدت ۱۰ دقیقه بر روی شیکر در دور RPM ۲۰۰ قرار دهید. این محلول بعد از آماده سازی ۷۲ ساعت در تاریکی و یخچال پایدار می‌باشد. با توجه به اینکه سبسترا بعد از آماده سازی بیش از ۷۲ ساعت پایدار ندارد، بنابراین دو ظرف در کیت قرار داده شده تا امکان استفاده مجدد کیت به کاربر داده شود.

آماده سازی نمونه: برای سنجش میزان فعالیت تیروزیناز در بافت گیاهی و جانوری، ابتدا ۱۷۵ میلی گرم از بافت گیاهی (۲۵ میلی گرم بافت جانوری) را در ۵۰۰ میکرولیتر بافر رقیق کننده نمونه کاملاً هموزن 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 با عبور دادن از کاغذ صافی، از مایع شفاف برای تست استفاده کنید. دقت نمایید در صورتیکه میزان جذب در نمونه بیشتر از ۲ باشد، بایستی با تست تیتراسیون تیترو مناسب (OD بین ۰/۶ تا ۱/۳) را به دست آورید. دقت کنید قبل از انجام تست برای تمام نمونه ها، ابتدا یک تست پایلوت بر روی سه نمونه انجام دهید تا در صورتیکه میزان رنگ در نمونه کم است، بایستی با استفاده از حمام التراسونیک (دمای ۴ درجه سانتیگراد، فرکانس ۴۰ کیلوهرتز، توان ۱۰۰-۲۰۰ وات، به مدت ۱۰ دقیقه به گونه ای که ۵ ثانیه روشن و ۵ ثانیه خاموش) نمونه را آماده کار کرده و سپس بعد از عبور از کاغذ صافی، در تست استفاده کنید.

روش انجام تست:

۱. قبل از شروع آزمایش مطمئن شوید تمام محلول ها دارای دمای محیطی باشند.
۲. ۸۰ میکرولیتر از بافر رقیق کننده نمونه به چاهک های الایزا اضافه کنید. دقت کنید به تعداد نمونه ها به چاهک ها بافر رقیق کننده اضافه کرده (مثلاً اگر ۸۰ نمونه دارید، به میزان ۸۰ میکرولیتر از بافر رقیق کننده به ۸۰ چاهک اضافه کنید) و یک چاهک را به عنوان بلانک در نظر گرفته و به آن ۱۸۰ میکرولیتر بافر رقیق کننده اضافه کنید.
۳. ۱۰۰ میکرولیتر نمونه به هر چاهک اضافه کنید (به بلانک نمونه اضافه نکنید) و با حرکت دست مخلوط کنید و اولین خوانش را در طول موج ۴۷۰ نانومتر انجام دهید (A1). دقت کنید در صورتیکه این طول موج را در اختیار ندارید از طول موج ۴۵۰ نانومتر استفاده کنید (با کاهش حساسیت در خوانش همراه خواهد بود).
۴. ۱۰۰ میکرولیتر از سوبسترا تیروزیناز به تمامی چاهک ها (نمونه و بلانک) اضافه کنید.
۵. پلیت را به آرامی حرکت داده تا مواد مخلوط شوند و به مدت ۲۰ دقیقه در دمای ۳۷ درجه سانتیگراد انکوبه کنید (دقت نمایید این دما برای ایجاد واکنش بهتر می باشد و ضروری نیست و می توان در دمای محیط انکوبه کرد) و در ادامه در طول موج ۴۷۰ نانومتر میزان جذب نمونه ها را اندازه گیری نمایید (A2).

محاسبات: برای محاسبه فعالیت تیروزیناز از فرمول زیر استفاده کنید:

$$\text{Tyrosinase activity (U/mL)} = \Delta A470 \times 500$$

در این فرمول عدد ثابت با محاسبه ضریب خاموشی، فاصله منبع تغذیه تا نمونه در پلیت الایزا، زمان واکنش و رقت نمونه محاسبه شده است و $\Delta A470$ هم تفاوت جذب بلانک با نمونه میباشد:

$$\Delta A470: (A2 \text{ Sample} - A1 \text{ Sample}) - A \text{ Blank}$$

برای A Blank از میانگین جذب ابتدا و انتهای واکنش بلانک استفاده کنید.

برای گزارش داده ها بر حسب میلی گرم بافت، در صورتیکه ۱۷۵ میلی گرم بافت استفاده کرده اید، یعنی ۳۵۰ میلی گرم بر میلی لیتر و با توجه به اینکه تنها ۱۰۰ میکرولیتر از حجم ۱۰۰۰ میکرولیتری در تست استفاده شده است، بنابراین عدد ۳۵ بر ۱۰ تقسیم شود. از این رو بایستی Tyrosinase activity (U/mL) را بر عدد ۳۵ تقسیم کنید. با همین منطق، در صورتیکه ۲۵ میلی گرم بافت استفاده کرده اید بایستی Tyrosinase activity (U/mL) را بر عدد ۵ تقسیم کنید و داده ها را با واحد U/mg گزارش کنید.

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 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 فعالیت SOD
۸. کیت اندازه گیری توتال پروتئین
۹. کیت بررسی فعالیت همزمان میلوپراکسیداز و میزان ROS
۱۰. کیت سنجش میزان فعالیت گلوکوتایون پراکسیداز (GPX)
۱۱. کیت بررسی میزان فعالیت آرزیناز

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. آنزیم های مولکولی از قبیل Klen-Taq DNA Polymerase و Reverse Transcriptase و پروتئیناز K
۸. نانوذرات آهن برای تخلیص DNA/RNA و پروتئین

Contact us

00989132926113

karmaniaparsgene@gmail.com

WWW.KARMANIAPARSGEN.IR