

A007-1 — 96 тестов

Набор для определения активности Каталазы (CAT)

Организм: для всех

ИНСТРУКЦИЯ

Только для научных исследований in vitro

Не для использования в клинической лабораторной диагностике

Внимание! Перевод сделан с инструкции, доступной на сайте производителя.
Обязательно сверяйтесь с инструкцией, вложенной в коробку с набором!

12я редакция

[ПРЕДНАЗНАЧЕНИЕ НАБОРА]

Набор предназначен для количественного измерения активности каталазы (CAT) in vitro в сыворотке, плазме, гемолизате, тканевых гомогенатах и т. д. Измерения проводятся в видимом световом диапазоне.

[ПОСТАВЛЯЕМЫЕ РЕАГЕНТЫ И МАТЕРИАЛЫ]

Реагенты	Количество	Реагенты	Количество
Реагент 1	1x100мл	Реагент 3	1
Реагент 2	1x10мл	Реагент 4	1x10мл
Инструкция	1		

Примечание: реагент 4 замерзает при низкой температуре, если это произошло, то перед использованием поместите его на водяную баню при температуре 37 °C, пока жидкость не станет полностью прозрачной.

[НЕОБХОДИМЫЕ МАТЕРИАЛЫ, НЕ ВХОДЯЩИЕ В КОМПЛЕКТ ПОСТАВКИ]

1. Спектрофотометр с возможностью считывания оптической плотности при длине волны 405 нм, и с кюветами с длиной оптического пути 0.5 см.
2. Термостатическая водяная баня или газовая ванна (37 °C)

3. Настольная центрифуга
4. Пипетки со сменными наконечниками.
5. Вортекс.
6. Бидистиллированная вода.

[ХРАНЕНИЕ НАБОРА]

Набор может храниться при температуре 2-8°C до 6 месяцев.

Реагент 1: раствор, хранить при температуре 4°C до 6 месяцев.

Реагент 2: раствор субстрата, хранить при температуре 4°C до 6 месяцев.

Реагент 3: хромогенный агент (порошок), хранить при температуре 4°C до 6 месяцев.

Реагент 4: раствор, хранить при температуре 4°C. Раствор может кристаллизоваться при пониженной температуре. В этом случае его следует нагреть на водяной бане до растворения кристаллов перед использованием.

[ПОДГОТОВКА РЕАГЕНТОВ]

Подготовка Реагента 3: довести бидистиллированной водой до объема 100мл. Убедиться, что произошло растворение. Если на дне наблюдается не растворившийся порошок, то можно использовать супернатант, это никак не повлияет на результат.

[ПОДГОТОВКА ОБРАЗЦОВ]

1. Сыворотка

Используйте пробирку для сыворотки, затем оставьте образцы на 2 часа свернуться при комнатной температуре или на ночь при 4°C до центрифугирования. Центрифугировать 10 минут при 2000 об/мин. Для анализа используйте свежеприготовленную сыворотку или сохраните аликвотированные образцы при -20 С или -80 С для использования позднее. Избегайте повторяющихся циклов заморозки/разморозки.

2. Плазма

Используйте ЭДТА или гепарин в качестве антикоагулянта. Центрифугируйте образцы 10 минут при 2000 об/мин при температуре +2...+8°C в течение 30 минут после их получения. Приступите к анализу незамедлительно или сохраните аликвотированные образцы при -20°C или -80°C для использования позднее. Избегайте повторяющихся циклов заморозки/разморозки.

3. Гемолизат

Возьмите 50 мкл цельной крови, доведите объем до 5 мл дистиллированной водой. Оставьте на 10 мин. Затем можно приступить к анализу.

4. Гомогенат ткани

Взвесьте образец ткани, добавьте 9-кратное количество дистиллированной воды чтобы

получить 10% гомогенат ткани. Центрифугируйте при 2500 об/мин 10 минут. Отберите супернатант, разведите его физраствором до оптимальной концентрации (см. приложение).

[ПРОЦЕДУРА АНАЛИЗА]

1. Сыворотка / плазма

Операционная таблица

	Кювета — контраст (мл)	Кювета - образец (мл)
Сыворотка/плазма		0.1
Реагент 1 (прогретый до 37°C)	1	1
Реагент 2 (прогретый до 37°C)	0.1	0.1
Перемешать, аккуратно поместить на водяную баню на 1 мин при 37°C		
Реагент 3	1	1
Реагент 4	0.1	0.1
Сыворотка/плазма	0.1	
Тщательно перемешать и оставить смесь при комнатной температуре на 10 минут. После этого поместить жидкость в кюветы с длиной оптического пути 0.5 см. По бидистиллированной воде откалибровать спектрофотометр на нуль. Измерить величину оптической плотности (ОП) при 405 нм.		

Для того, чтобы провести анализ наиболее эффективно, вы можете сначала сделать все приготовления. Пометить все кюветы номерами, добавить по 0.1 мл образца и 1 мл реагента 1, а затем поместить все пробирки на водяную баню 37°C на 3-5 минут. Во время этой операции добавьте 0.1 мл реагента 2. Точно отмеряйте время. незамедлительно смешайте, поместите на 37°C водяную баню. Когда t=1мин, немедленно добавьте хромогенный агент и прекратите реакцию, хорошо перемешайте. Затем вы можете работать с кюветой 2, кюветой 3, ..., кюветой с контрастом и с кюветой с образцом. Кювету с контрастом и кювету с образцом следует измерять в одно и то же время.

2. 1:99 гемолизат

Операционная таблица

	Кювета — контраст (бланк) (мл)	Кювета - образец (мл)	Кювета — контраст (мл)
Дистиллированная вода (мл)	0.05		02.01.18
1:99 гемолизат (мл)		0.05	0.05
Реагент 1 (прогретый до 37°C)	1	1	
Реагент 2 (прогретый до 37°C)	0.1	0.1	
Перемешать, аккуратно поместить на водяную баню на 1 мин при 37°C			
Реагент 3	1	1	
Тщательно перемешать и оставить смесь при комнатной температуре на 10 минут. После этого поместить жидкость в кюветы с длиной оптического пути 0.5 см. По бидистиллированной воде откалибровать спектрофотометр на нуль. Измерить величину оптической плотности (ОП) при 405 нм.			

3. Гомогенат ткани

Операционная таблица

	Кювета — контраст (мл)	Кювета - образец (мл)
Гомогенат ткани		0.05
Реагент 1 (прогретый до 37°C)	1	1
Реагент 2 (прогретый до 37°C)	0.1	0.1
Перемешать, аккуратно поместить на водяную баню на 1 мин при 37°C		
Реагент 3	1	1
Реагент 4	0.1	0.1
Сыворотка/плазма	0.05	
Тщательно перемешать и оставить смесь при комнатной температуре на 10 минут. После этого поместить жидкость в кюветы с длиной оптического пути 0.5 см. По бидистиллированной воде откалибровать спектрофотометр на нуль. Измерить величину оптической плотности (ОП) при 405 нм.		

[ПРИНЦИПЫ ТЕСТА]

Молибдат аммония может приостановить реакцию разложения H_2O_2 , катализируемую каталазой (CAT) немедленно, остаточная H_2O_2 может реагировать с молибдатом аммония с образованием комплекса желтоватой окраски. Активность CAT может быть рассчитана путем измерения значения ОП на длине волны 405 нм.

[РАСЧЕТ РЕЗУЛЬТАТОВ]

1. Сыворотка/плазма

1.1 Определение единицы активности

Единица активности определяется как 1 мкмоль H_2O_2 , разлагающийся в 1 мл сыворотки (плазмы) в 1 секунду..

1.2 Формула

$$\text{Активность (Ед/мл)} = (ОП_{\text{контраста}} - ОП_{\text{образца}}) \times 271^* \times \frac{1}{60 \times V_{\text{образца}}} \times K$$

где

$ОП_{\text{контраста}}$ — оптическая плотность в кювете с контрастом;

$ОП_{\text{образца}}$ — оптическая плотность в кювете с образцом;

$V_{\text{образца}}$ - объем образца в мл;

271* - обратная величина наклона;

K — коэффициент разведения образца.

1.3 Пример

Измерили значения оптической плотности для 0.1 мл сыворотки. В кювете с контрастом она составила 0.720, а в кювете с образцом 0.675.

$$\begin{aligned} \text{Активность (Ед/мл)} &= (ОП_{\text{контраста}} - ОП_{\text{образца}}) \times 271^* \times \frac{1}{60 \times V_{\text{образца}}} \times K = \\ &= (0.720 - 0.675) \times 271 \times \frac{1}{60 \times 0.1 \text{ мл}} \times 1 = 2.03 \text{ Ед/мл} \end{aligned}$$

2. Гемоглобин

2.1 Определение единицы активности

Единица активности определяется как 1 мкмоль H_2O_2 , разлагающийся в 1 мг гемоглобина в 1 секунду.

2.2 Формула

$$\text{Активность (Ед/мг Hb)} = (ОП_{\text{бланк.контраст}} + ОП_{\text{контраст}} - ОП_{\text{образца}}) \times 271^* \times \frac{1}{60 \times V_{\text{образца}}} \div C_{\text{Hb}}$$

где

$ОП_{\text{бланк.контраст}}$ — оптическая плотность в кювете с контрастом бланком;

$ОП_{\text{контраст}}$ — оптическая плотность в кювете с контрастом;

$ОП_{\text{образца}}$ — оптическая плотность в кювете с образцом;

$V_{\text{образца}}$ - объем образца в мл;

271^* - обратная величина наклона;

C_{Hb} — концентрация гемоглобина в гемолизате в мг/мл.

2.3 Пример

Измерили значения оптической плотности для 0.05 мл 1:99 гемолизата, полученного от мыши. В кювете с контрастом-бланком она составила 0.569, в кювете с контрастом 0.105, а в кювете с образцом 0.516. Содержание гемоглобина в 1:99 гемолизате — 1.324 мг Hb/мл.

$$\begin{aligned} \text{Активность (Ед/мг Hb)} &= (ОП_{\text{бланк.контраст}} + ОП_{\text{контраст}} - ОП_{\text{образца}}) \times 271^* \times \frac{1}{60 \times V_{\text{образца}}} \div C_{\text{Hb}} = \\ &= (0.569 + 0.105 - 0.516) \times 271 \times \frac{1}{60 \times 0.05 \text{ мл}} \div 1.324 = 10.78 \text{ Ед/мг Hb} \end{aligned}$$

3. Гомогенат ткани

3.1 Определение единицы активности

Единица активности определяется как 1 мкмоль H_2O_2 , разлагающийся в 1 мг белка из гомогената ткани в 1 секунду.

3.2 Формула

$$\text{Активность (Ед/мг белка)} = (ОП_{\text{контраста}} - ОП_{\text{образца}}) \times 271^* \times \frac{1}{60 \times V_{\text{образца}}} \div C_{\text{белка}}$$

где

$ОП_{\text{контраста}}$ — оптическая плотность в кювете с контрастом;

$ОП_{\text{образца}}$ — оптическая плотность в кювете с образцом;

$V_{\text{образца}}$ - объем образца в мл;

271^* - обратная величина наклона;

$C_{\text{белка}}$ — концентрация белка в гомогенате в мг/мл.

3.3 Примеры

Измерили значения оптической плотности для 0.05 мл 0.5% гомогената печени крысы. В кювете с контрастом она составила 0.671, а в кювете с образцом 0.445. Концентрация белка в гомогенате 0.48 мг/мл.

$$\begin{aligned} \text{Активность (Ед/мг)} &= (ОП_{\text{контраста}} - ОП_{\text{образца}}) \times 271^* \times \frac{1}{60 \times V_{\text{образца}}} \div C_{\text{белка}} = \\ &= (0.671 - 0.445) \times 271 \times \frac{1}{60 \times 0.05} \div 0.48 = 42.53 \text{ Ед/мг} \end{aligned}$$

Измерили значения оптической плотности для 0.05 мл 5% гомогената ткани дождевого червя. В кювете с контрастом она составила 0.605, а в кювете с образцом 0.425. Концентрация белка в гомогенате 3.1158 мг/мл.

$$\begin{aligned} \text{Активность (Ед/мг)} &= (ОП_{\text{контраста}} - ОП_{\text{образца}}) \times 271^* \times \frac{1}{60 \times V_{\text{образца}}} \div C_{\text{белка}} = \\ &= (0.605 - 0.425) \times 271 \times \frac{1}{60 \times 0.05} \div 3.1158 = 5.2185 \text{ Ед/мг} \end{aligned}$$

Измерили значения оптической плотности для 0.05 мл 10% гомогената листьев риса. В кювете с контрастом она составила 0.704, а в кювете с образцом 0.332. Концентрация белка в гомогенате 3.1303 мг/мл.

$$\begin{aligned} \text{Активность (Ед/мг)} &= (ОП_{\text{контраста}} - ОП_{\text{образца}}) \times 271^* \times \frac{1}{60 \times V_{\text{образца}}} \div C_{\text{белка}} = \\ &= (0.704 - 0.332) \times 271 \times \frac{1}{60 \times 0.05} \div 3.1303 = 10.7351 \text{ Ед/мг} \end{aligned}$$

Измерили значения оптической плотности для 0.05 мл 0.5% гомогената ткани печени осетра (*Acipenser sinensis*). В кювете с контрастом она составила 0.580, а в кювете с образцом 0.426. Концентрация белка в гомогенате 0.3063 мг/мл.

$$\text{Активность (Ед/мг)} = (\text{ОП}_{\text{контраста}} - \text{ОП}_{\text{образца}}) \times 271 * \times \frac{1}{60 \times V_{\text{образца}}} \div C_{\text{белка}} =$$

$$= (0.580 - 0.503) \times 271 \times \frac{1}{60 \times 0.05} \div 0.3063 = 22.7058 \text{ Ед/мг}$$

[ВАЖНЫЕ ЗАМЕЧАНИЯ]

1. Когда вы проводите анализ сыворотки / плазмы и в образце нет гемолиза, тогда вам просто можно взять 2 случайных образца для контраста на текущий эксперимент или использовать бидистиллированную воду для контраста. Если же гемолиз есть, тогда необходимо использовать кювету с контрастом для каждого образца.
2. Когда вы проводите анализ гомогената ткани и в образце нет гиперлипемии, тогда вам просто можно взять 2 случайных образца для контраста на текущий эксперимент или использовать бидистиллированную воду для контраста. Если же гиперлипемия есть, тогда необходимо использовать кювету с контрастом для каждого образца.
3. Когда вы проводите анализ для цельной крови, то вы должны использовать кювету с контрастом для каждого образца.

[ПРИЛОЖЕНИЕ]

Пример определения оптимальной концентрации.

1. Реагенты подготовить в соответствии с инструкцией.
2. Образец: нормальная ткань печени мыши, 10% гомогенат, разбавленный физиологическим раствором в разных концентрациях.

3. Операционная таблица

	Кювета — контраст (мл)	Кювета - образец (мл)
Гомогенат ткани		0.05
Реагент 1 (прогретый до 37°C)	1	1
Реагент 2 (прогретый до 37°C)	0.1	0.1
Перемешать, аккуратно поместить на водяную баню на 1 мин при 37°C		
Реагент 3	1	1
Реагент 4	0.1	0.1
Сыворотка/плазма	0.05	
Тщательно перемешать и оставить смесь при комнатной температуре на 10 минут. После этого поместить жидкость в кюветы с длиной оптического пути 0.5 см. По бидистиллированной воде откалибровать спектрофотометр на нуль. Измерить величину оптической плотности (ОП) при 405 нм.		

4. Результаты

Концентрация гомогената (%)	ОП1	ОП2	Средняя ОП	ΔОП
0.125	0.613	0.612	0.613	0.058
0.25	0.556	0.560	0.558	0.113
0.5	0.440	0.449	0.445	0.226
1	0.258	0.258	0.258	0.413
2	0.058	0.059	0.059	0.612
5	0.021	0.018	0.020	0.651
10	0.032	0.031	0.032	0.639
Контраст	0.669	0.673	0.671	

5. Подбор оптимальной концентрации

Пробные концентрации выбираем от 0.25% до 1%. В этом диапазоне кривая «концентрация-оптическая плотность» является линейной. Если концентрация слишком велика или слишком низка, то результаты после статистической обработки не будут иметь значимого отклонения.

