

EZ-Catalase Assay Kit

Oxidative Stress Assay Kit

Cat. No. DG-CAT400

FOR RESEARCH USE ONLY.

NOT FOR USE IN DIAGNOSTIC PROCEDURES.

▪ Product Description

Catalase는 대표적인 항산화 효소로 생존하는 대부분의 동·식물에 존재하며, 일반적으로 호기성 물질대사에서 생성되는 독성물질인 H₂O₂나 활성산소종 (Reactive Oxygen Species, ROS)의 분해작용에 관여하는 것으로 알려져 있습니다. 이러한 catalase가 관여하는 분해작용에는 촉매 활성(Catalytic activity)과 과산화 활성(peroxidatic activity) 작용이 있습니다. 촉매 활성에서는 두 분자의 H₂O₂를 한 분자의 산소와 두 분자의 물로 전환되는 반응을 촉진시키는 역할을 담당하며, 과산화 활성에서는 알코올의 저분자화 반응에서 전자공여체의 역할을 수행하고 있습니다. 인체에서는 간, 신장, 적혈구에서 많이 존재하며, 주로 H₂O₂ 분해 반응에 관여하는 것으로 알려져 있습니다.

EZ-Catalase assay kit는 높은 민감도와 간단한 실험방법을 통해 정확한 catalase의 측정이 가능한 제품으로 50 mU/ml의 적은 양의 catalase 측정이 가능하며, 형광과 흡광측정 방법 모두 사용 가능합니다.

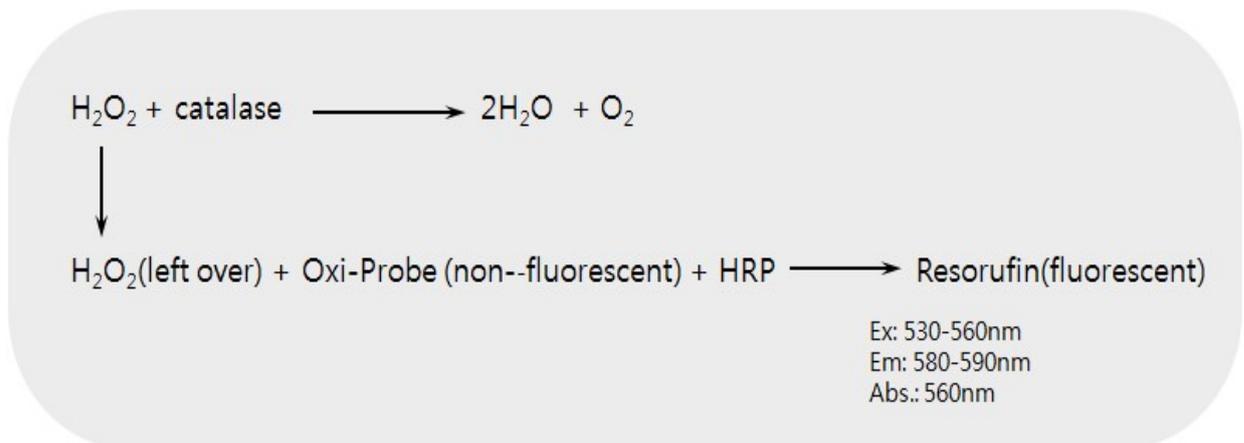


Fig. Detection mechanism with EZ-Catalase assay kit

Sample안의 Catalase는 H₂O₂를 물(H₂O)과 산소(O₂)로 분해 합니다.

이때 분해되는 H₂O₂는 catalase의 활성과 비례하며, 분해되지 않고 남은 H₂O₂는 horseradish-peroxidase(HRP)가 존재하는 상태에서 Oxi-Probe 시약과 1:1로 반응하게 되며, 이때 산화적 형광 생성물인 resorufin이 생성되게 됩니다.

이러한 반응의 결과에서 resorufin의 양이 적다는 것은 catalase 활성 증가를 의미하며, catalase의 활성이 좋을수록 형광 또는 흡광 측정값이 낮아지게 됩니다.

▪ Kit Contents and Storage Conditions

| Components | 400 assay | Storage |
|---|-------------------|---------|
|  Oxi-Probe (MW=257) | 2 vial | -20°C |
|  Dimethylsulfoxide (DMSO), anhydrous | 500 μl | |
|  Horseradish peroxidase (HRP, 20U) | 1 vial | |
|  Hydrogen peroxide (H_2O_2 , 3%, 0.88M) | 500 μl | |
| 5X Reaction Buffer (pH 7.5, 0.5 M) | 20 ml | |
|  Catalase (1,000 U/ml) | 1 vial | |

* 개봉전 Kit 는 -20°C에서 6개월간 안정합니다.

* Oxi-Probe 시약의 경우 공기에 매우 민감합니다. 개봉 후 빠른 시간에 사용을 권장하며, 반드시 빛의 노출에 주의하십시오.

▪ Preparation of Stock Solution

| Solution | Preparation | Storage |
|--|--|--|
| 10 mM Oxi-Probe | Oxi-Probe 와 DMSO vial을 실온에서 충분히 녹여 줍니다. 하나의 Oxi-Probe vial에 100 μl DMSO를 넣어 잘 섞어줍니다. *Amplex Red 1vial당 200assay 가 가능합니다. | 남은 용액은 -20°C에 보관하시고, 사용 직전 혼합하여 사용하기 바랍니다. **Protect from light |
| 1X Reaction Buffer | 4 ml의 5X Reaction Buffer 와 16 ml deionized water (dH_2O)을 잘 섞어줍니다. | |
| 100 U/ml horseradish-peroxidase (HRP) | HRP vial에 200 μl 1X Reaction Buffer를 넣어 잘 섞어줍니다. | 남은 용액은 작은 용량으로 분주하여 -20 °C에서 보관하십시오. |
| 20 mM Hydrogen - peroxide (H_2O_2) | 23 μl 의 3.0 % H_2O_2 와 977 μl dH_2O 를 잘 섞어줍니다. | 혼합한 용액은 안정성이 매우 낮아 보관이 어렵습니다. 실험 시 필요량만 섞어 사용하기 바랍니다. |
| 1,000 U/ml catalase | Catalase vial에 100 μl dH_2O 를 넣어 잘 섞어줍니다. | 남은 용액은 작은 용량으로 분주하여 -20 °C에서 보관하십시오. |

▪ Interference

1. Oxi-Probe 반응에 의해 생성되는 반응물인 Resorufin은 dithiothreitol (DTT), 2-mercaptoethanol 과 같은 thiol계 물질에 불안정 합니다.
2. 실험 진행 시 sample에 함유된 DTT와 2-mercaptoethanol의 최종 농도는 10 μ M 보다 높지 않아야 합니다.
3. 실험 진행 시 pH에 유의하여 주십시오 (적정 pH=7~8).
4. 반응최종산물인 Resorufin의 흡광 혹은 형광 측정값은 pH에 의해 변화됩니다. pK_a=6.0 미만에서는 Resorufin의 흡광 또는 형광 파장이 달라지며 감도가 현저하게 떨어집니다. 또한 Oxi-Probe는 pH 8.5 이상에서는 불안정하여 정확한 측정이 어렵습니다. 따라서, 실험진행 시 pH 7~8 에서 진행해야 함을 유의하여 주시고, kit에 포함되어 있는 완충액(Reaction Buffer, pH 7.5)을 사용하여 주시기 바랍니다.

▪ General Protocol

1. Catalase standard preparation

: 1,000 U/ml catalase 용액 5 μ l와 1X Reaction Buffer 995 μ l를 섞어 5.0 U/ml catalase standard 용액을 만들어 줍니다.

96-well plate에 아래와 같이 solution을 넣어 catalase standard를 준비합니다.

- ① 정확한 측정을 위해 standard및 sample은 각각 two replicates 이상으로 준비하여 실험하는 것이 좋습니다.
- ② Standard는 실험 시 마다 측정하시기 바랍니다.
- ③ Catalase standard 희석 시 각 농도 별로 충분히 희석하여 필요량을 사용하시는 것이 좋습니다.

Ex) Standard #2 준비 시 5.0U/ml catalase standard 3.75 μ l + 1X Reaction Buffer 71.25 μ l를 섞어 총 75 μ l를 만들어 실험 시 25 μ l씩 well에 분주하여 사용합니다.

| No | 5.0U/ml catalase standard | 1X Reaction Buffer | Total volume | Final catalase concentration |
|----|---------------------------|--------------------|--------------|------------------------------|
| 1 | - | 25 μ l | 25 μ l | 0 mU/ml |
| 2 | 1.25 μ l | 23.75 μ l | 25 μ l | 62.5 mU/ml |
| 3 | 2.5 μ l | 22.5 μ l | 25 μ l | 125 mU/ml |
| 4 | 5 μ l | 20 μ l | 25 μ l | 250 mU/ml |
| 5 | 10 μ l | 15 μ l | 25 μ l | 500 mU/ml |
| 6 | 20 μ l | 5 μ l | 25 μ l | 1000 mU/ml |

Table. protocol for catalase standard curve.

2. 준비된 sample을 96-well plate에 25 μl 씩 넣어 줍니다.

➤ Sample을 희석할 경우 1X Reaction Buffer를 사용하시기 바랍니다.

3. **40 μM H₂O₂ preparation**

: 20 mM H₂O₂ 용액 10 μl 와 1X Reaction Buffer 4.99 mL을 섞어 준비하여 줍니다.

4. 40 μM H₂O₂용액을 sample과 standard가 준비된 각 well에 25 μl 씩 넣어 줍니다.

5. Plate를 빛이 차단된 실온에서 30분간 반응시킵니다.

6. **Oxi-Probe/HRP Working Solution preparation:** (100assay)

| Components | Volume |
|--------------------------------------|------------------|
| 10 mM Oxi-Probe | 50 μl |
| 100U/mL horseradish-peroxidase (HRP) | 20 μl |
| 1X Reaction Buffer | 5 mL |

Table. protocol for Oxi-Probe/HRP Working Solution.

7. 5번 반응이 완료된 plate에 Oxi-Probe/HRP Working Solution을 각 well에 50 μl 씩 넣어 줍니다.

8. 빛이 차단된 37°C의 장소에서 30분간 반응시킵니다.

9. 반응이 끝난 plate는 plate reader를 사용하여 반응 값을 측정합니다.

① Fluorescence plate reader를 사용할 경우 – Excitation: 530 ~ 560nm

Emission: 580 ~ 590nm

(optimal Ex/Em = 540/590)

② Absorbance plate reader를 사용할 경우 – 560nm

▪ Calculation

1. Negative control의 측정값에서 각 well의 측정값을 빼줍니다.
* Negative control = catalase standard #1 (0 mU/mL catalase)
2. Horseradish peroxidase (HRP) 1 unit의 HRP의 활성은 pH 6.0, 20 °C에서 20초 동안 pyrogallol로부터 purpurogallin 1.0 mg을 생성하는 양을 말합니다.
3. Catalase 1 unit은 pH 7.0, 25 °C에서 1분 동안 H₂O₂를 1 μmole를 분해하는 양을 말합니다.

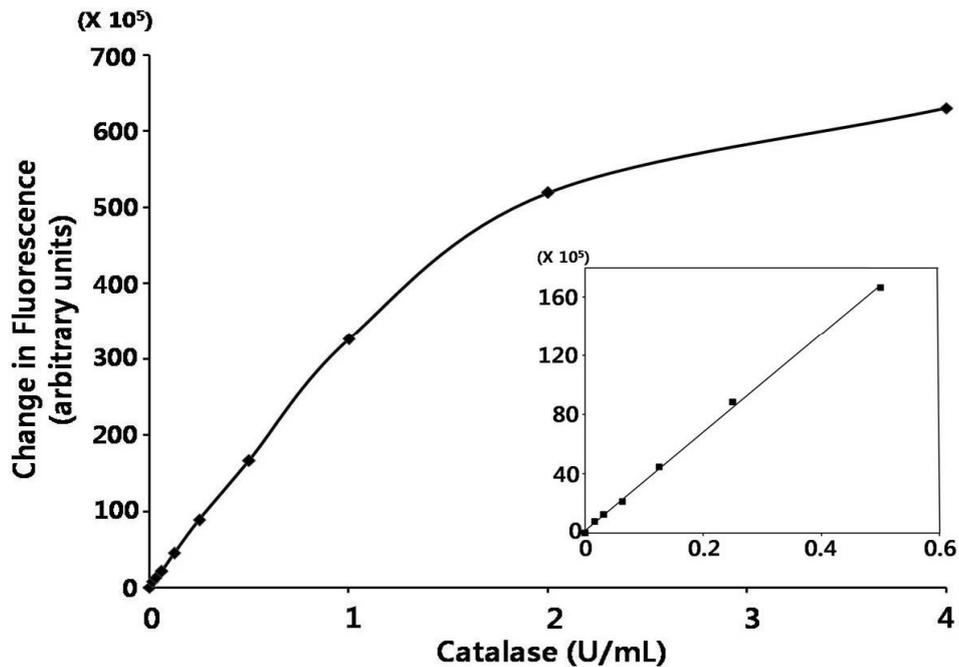


Fig. Catalase standard curve. Assay was performed following the kit protocol.

▪ Related Product

| | Products | Catalog No. | Assay |
|---|--|-------------|-----------|
| Oxidative Stress Assay Kit | EZ-Superoxide Dismutase (SOD) Assay Kit (Colorimetric) | DG-SOD400 | 400 Assay |
| | EZ-Glutathione Assay Kit (Colorimetric) | DG-GLU200 | 200 Assay |
| | EZ-Hydrogen peroxide/Peroxidase Assay Kit (Fluorometric/Colorimetric) | DG-PER500 | 500 Assay |
| | EZ-Lipid Peroxidation (TBARS) Assay Kit (Colorimetric) | DG-TBA200 | 200 Assay |
| | EZ-Total Antioxidant Capacity (TAC) Assay Kit (Colorimetric) | DG-TAC200 | 200 Assay |
| | EZ-DPPH Antioxidant Assay Kit (Colorimetric) | DG-DPH400 | 400 Assay |
| | EZ-ABTS Antioxidant Assay Kit (Colorimetric) | DG-ABT400 | 400 Assay |
| | EZ-Glutathione Peroxidase Assay Kit (Colorimetric) | DG-GPX100 | 100 Assay |
| | EZ-Lactate Assay Kit (Colorimetric) | DG-LAC100 | 100 Assay |
| | EZ-Acetylcholinesterase Assay Kit (Colorimetric) | DG-ACE100 | 100 Assay |
| Metabolism Assay Kit | EZ-Ascorbic Acid Assay Kit (Colorimetric) | DG-ASC100 | 100 Assay |
| | EZ-ATP Assay Kit (Fluorometric/Colorimetric) | DG-ATP100 | 100 Assay |
| | EZ-Free Fatty Acid Assay Kit (Fluorometric/Colorimetric) | DG-FFA100 | 100 Assay |
| | EZ-Free Glycerol Assay Kit (Fluorometric/Colorimetric) | DG-FGC100 | 100 Assay |
| | EZ-Glucose Assay Kit (Fluorometric/Colorimetric) | DG-GCS100 | 100 Assay |
| | EZ-HDL, LDL/VLDL Assay Kit (Fluorometric/Colorimetric) | DG-CHO100 | 100 Assay |
| | EZ-Total Cholesterol Assay Kit (Fluorometric/Colorimetric) | DG-TSC100 | 100 Assay |
| | EZ-Triglyceride Quantification Assay Kit (Fluorometric/Colorimetric) | DG-TGC100 | 100 Assay |
| | EZ-Nitric Oxide Assay Kit (Colorimetric) | DG-NO500 | 500 Assay |
| | EZ-Total Collagen Assay Kit (Colorimetric) | DG-COL100 | 100 Assay |
| EZ-Ethanol Assay Kit (Colorimetric) | DG-ETH100 | 100 Assay | |