Taligene Pars

Paraoxonase 1 Activity Assay Kit

Catalog No: TGP-PON-2011
96T

Taligene Pars Company No. 16,
Commercialization Complex, Isfahan Science and Technology Town, Isfahan, Iran.
Taligene@yahoo.com
Phone +98 3133932373
+98 9130390282
Fax +983133932374

http://www.taligene.com

I. Introduction

Paraoxonase 1 (PON1, EC 3.1.8.1) is an HDL-associated esterase/lactonase enzyme mainly synthesized in the liver and released into the bloodstream. PON1 hydrolysis highly toxic organophosphorus compounds such as the pesticide, paraoxon and various nerve agents used as chemical weapons. Additionally PON1 has PON1 .protective effect against oxidative damage has anti-atherogenic properties and protects serum HDL and LDL particles against lipid peroxidation. PON1 inhibits N-homocysteinylation of LDL-associated proteins by hydrolyzing the highly reactive pro-oxidant homocysteine thiolactone. Measurement of serum PON1 activity has been proposed as an antioxidant capacity index and biomarker of liver and cardiovascular disease.

II. Principle of Assay

Taligene's Paraoxonase 1 Activity Assay Kit enables rapid measurement of PON1 activity by only one assay reagent. In this assay, PON1 catalyzes the cleavage of paraoxon resulting in p-nitrophenol formation. The rate of formation of p-nitrophenol is measured by monitoring the increase in absorbance at 412 nm at 25ºC.

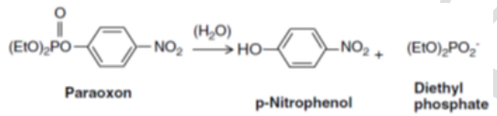


Fig. 1. Reaction of PON 1 (1).

III. Kit Components

The working reagent consists of Tris/HCl buffer, pH 8.0, containing $CaCl_2$, paraoxon as the substrate and stabilizer. Reagent is ready to use.

IV. Storage Conditions

Store components at 2-8 ºC until their expiration dates.

V. Samples

Blood serum, heparinized plasma, seminal plasma, cell lysates, and tissue homogenates can be used as sample.

VI. Pre-assay preparation

- Sample preparation

– **Serum:** Use a serum separator tube (SST) and allow samples to clot for two hours at room temperature or overnight at 4°C before centrifugation for 15 minutes at 1000 ×g. Remove serum and assay immediately or aliquot and store samples at -20°C or -80°C. Avoid repeated freeze-thaw cycles.

–**Plasma:** Collect plasma using heparin as an anticoagulant. Centrifuge for 15 minutes at 1000 x g. Assay immediately or aliquot and store samples at -20°C or -80°C. Avoid repeated freeze-thaw cycles.

–**Cell Culture Supernatant:** Remove particulates by centrifugation for 15 minutes at 1000 x g, 2 - 8°C and assay immediately or aliquot and store samples at -20°C or -80°C. Avoid repeated freeze-thaw cycles.

–**Tissue Homogenates:** You'd better get detailed references from other literatures before assay aiming at different tissue types. In general, tissue pieces should be weighed and then homogenized in PBS (the volume depends on the weight of the tissue) with a glass homogenizer on ice. The homogenates are then centrifuged for 5 minutes at 5000×g to get the supernatant.

Note: As PON1 is a strongly Ca^{2+} dependent enzyme, heparinized plasma samples should be used. Plasma specimens collected with EDTA or other Ca^{2+} chelating anticoagulants may exhibit reduced PON1 activity.

VII. Assay procedure

Step 1: Turn on spectrophotometer and allow instrument to initialize for 15 minutes.

Step 2: Clean cuvettes with alcohol. Rinse well with deionized water.

Step 3: Zero spectrophotometer at 412 nm with 1000 µl working reagent (Blank).

Step 4: Pipette the following into the cuvette:

- 1000 µl working reagent
- 25 µl sample

Note: The reaction should be perfectly linear and there should be no plateauing. These would indicate the need to dilute or concentration samples further. In manual working, the volumes of the sample could be 5-100µl.

Step 5: Pipette up and down to mix thoroughly, while avoiding bubble formation.

Step 6: Place cuvette in the correct position in the spectrophotometer. Record the change in A_{412} for 2 min.

VIII. Calculations

One unit of paraoxonase activity is the amount of enzyme that generates 1 µmole of p-nitrophenol per min at 25°C and pH 8.

Molar extinction coefficient for p-nitrophenol is 18290 M^{-1} cm^{-1}= 0.018290 µ M^{-1} cm^{-1}

A theoretical unique factor is determined to convert change in absorbance per minute (ΔA/min) to the corresponding units of enzyme activity. This factor is calculated using the following equation:

U/L = ΔA/minute × F; where F= factor

F = (TV/SV) / 0.018290 where;

TV = Total Volume in µl

SV = Sample Volume in µl

0.018290 = micro molar extinction coefficient

This factor can be programmed into the spectrophotometer and the machine directly converts the change in absorbance at 412 nm (ΔA/min) to activity in U/L.

IX. Example of Results

PON1 activity was assayed at 25ºC with a cuvette path length of 1 cm using the assay procedure above. Change in absorbance was recorded every 20 seconds up to 2 minutes.

U/L = ΔA/minute × F

initial absorbance=0.0

final absorbance = 0.6

ΔA/min = 0.3

Paraoxonase activity U/L=

(0.3)×(1025/25)/0.01829= 672.4

Note: Results for diluted samples must be multiplied by their dilution factor.

Warning: Wear gloves and masks while performing the task.

X. References

1. Mackness B, Mackness M, Aviram M., Paragh G. The Paraoxonases: Their Role in Disease Development and Xenobiotic Metabolism. Dordrecht; Netherland, Springer, 2008:3-260.

2. Bełtowski J, Wójcicka G, Jamroz A. Leptin decreases plasma paraoxonase 1 (PON1) activity and induces oxidative stress: the possible novel mechanism for proatherogenic effect of chronic hyperleptinemia. Atherosclerosis 2003;170(1):21-9.

Taligene Pars

تالی ژن پارس

کیت سنجش فعالیت پاراکسوناز ۱

شماره‌ی سفارش:

TGP-PON- ۲۰۱۱

کیت ۹۶ تستی

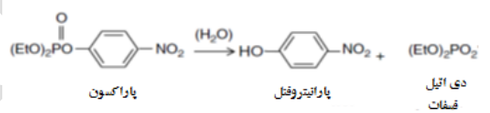
ایران، اصفهان، شهرک علمی و تحقیقاتی اصفهان،
مجتمع تجاری‌سازی، واحد ۱۶
Taligene@yahoo.com
تلفن: +۹۸۳۱۳۳۹۳۲۳۷۳
+۹۸۹۱۳۰۳۹۰۲۸۲
فکس: +۹۸۳۱۳۳۹۳۲۳۷۴
http://www.taligene.com

I. مقدمه

پاراکسوناز ۱ (PON۱ ،EC ۳.۱.۸.۱) یک آنزیم استراز/لاکتونازی مرتبط با HDL است که عمدتاً در کبد تولید شده و به جریان خون می‌ریزد. PON۱ هیدرولیز ترکیبات ارگانوفسفره بسیار سمی مانند آفت کش‌ها، پاراکسون و عوامل عصبی مختلف که به عنوان سلاح‌های شیمیایی استفاده می‌شوند را بر عهده دارد. علاوه بر این، PON۱ دارای آثار محافظتی در برابر آسیب‌های استرس اکسیداتیو است. PON۱ با فعالیت آنتی- آنتروژنیک خود از ذرات سرمی HDL و LDL در برابر پراکسیداسیون لیپیدی محافظت می‌کند. PON۱ از طریق هیدرولیز هموسیستئین تیولاکتون که یک ترکیب شدیدا واکنشگر پرواکسیدان است، منجر به مهار هموسیستئینی شدن پروتئین‌های وابسته به LDL می‌شود. اندازه‌گیری فعالیت PON۱ سرم به عنوان شاخص ظرفیت آنتی اکسیدانی و نشانگر بیماری‌های کبدی و قلبی-عروقی ارائه شده است.

II. اساس آزمایش

کیت سنجش فعالیت پاراکسوناز ۱ شرکت تالی ژن پارس اندازه‌گیری سریع فعالیت PON۱ را تنها با استفاده از یک معرف فراهم نموده



شکل ۱. واکنش پاراکسوناز ۱

III. محتویات کیت

محلول آماده به کار حاوی بافر Tris-HCL (pH: ۸) ، $CaCl_2$ و پاراکسون به عنوان سوبسترا و پایدارکننده می باشد. معرف آماده برای مصرف است.

IV. شرایط نگهداری

محتویات کیت را در دمای ۸-۲ °C تا تاریخ انقضاء نگهداری نمایید.

V. نمونه‌ها

سرم، پلاسما هپارینه، سمن، عصاره سلول، و بافت.

VI. آماده سازی

• آماده سازی نمونه

-سرم: از لوله جمع آوری کننده سرم استفاده کرده و اجازه دهید نمونه به مدت دو ساعت در دمای اتاق یا یک شب در ۴ °C قبل از سانتریفوژ به مدت ۱۵ دقیقه در ۱۰۰۰×g لخته شود. سرم را جدا نموده و بلافاصله سنجش نمایید و یا نمونه در ۲۰- الی ۸۰- درجه‌ی سانتی گراد نگهداری شود. از تکرار چرخه انجماد و ذوب پرهیز شود.

-پلاسما: با استفاده از هپارین به عنوان ماده ضد انعقاد پلاسما را جمع آوری نمایید. نمونه به مدت ۱۵ دقیقه در ۱۰۰۰×g سانتریفوژ شود و بلافاصله سنجش شود و یا نمونه را در ۲۰- الی ۸۰- درجه‌ی سانتی گراد نگهداری کنید. از تکرار چرخه انجماد و ذوب پرهیز شود.

- سوپرناتانت کشت سلولی: به منظور حذف ذرات نمونه، سانتریفوژ به مدت ۱۵ دقیقه در ۱۰۰۰×g انجام شود. بلافاصله سنجش نمایید و یا نمونه را در ۲۰- الی ۸۰- درجه‌ی سانتی گراد نگهداری کنید. از تکرار چرخه انجماد و ذوب پرهیز شود.

-بافت: بهتر است قبل از آزمایش منابع برای بافت های متفاوت بررسی شود. به طور کلی، قطعات بافت باید وزن شده و با استفاده از هموژنایزر شیشه‌ای در PBS (حجم بستگی به وزن بافت دارد) بر روی یخ هموژنیزه شوند. هموژنات به مدت ۵ دقیقه در ۵۰۰۰×g سانتریفوژ شده و سوپرناتانت جدا گردد.

توجه: PON۱ یک آنزیم وابسته $Ca^{+۲}$ است، بنابراین پلاسمای هپارینه باید استفاده شود. EDTA یا سایر مواد ضد انعقاد شلاته کننده‌ی $Ca^{+۲}$ ممکن است فعالیت PON۱ را کاهش دهند.

VII. روش انجام آزمایش

مرحله ۱: اسپکترومتر را روشن کرده و ۱۵ دقیقه منتظر بمانید تا دستگاه گرم و آماده به کار شود.

مرحله ۲: کووت‌ها را با الکل تمیز کرده و با آب مقطر بشویید.

مرحله ۳: اسپکترومتر را با استفاده از محلول آماده به کار در طول موج ۴۱۲ nm صفر کنید (بلانک).

مرحله ٤: مقادیر زیر را درون کووت بریزید

- ۱۰۰۰ میکرولیتر معرف کار
- ۲۵ میکرولیتر نمونه

توجه: واکنش باید کاملا خطی باشد و هیچگونه انحرافی دیده نشود. هر گونه انحراف نیاز به رقیق نمودن یا غلیظ نمودن نمونه را نشان می-دهد. بنابراین می‌توان حجم نمونه را بین ۵ تا ۱۰۰ میکرولیتر انتخاب کرد.

مرحله ۵: به سرعت چند بار با سمپلر محتویات کووت را مخلوط نمایید.

مرحله ٦: کووت را در درون دستگاه قرار داده و جذب آن را پس از ۲ دقیقه در طول موج ۴۱۲ nm بخوانید.

VIII. اندازه گیری‌ها

یک واحد از فعالیت آنزیم پاراکسوناز مقدار آنزیمی است که µmole ۱ از پارانیتروفنل را در هر دقیقه در ۲۵ °C و pH ۸ تولید می‌کند.

ضریب جذب مولی برای پارانیتروفنل

۱۸۲۹۰ $M^{-1}\ cm^{-1}$=۰/۰۱۸۲۹۰ $\mu\ M^{-1}\ cm^{-1}$

تغییرات جذب نسبت به زمان متناسب با فعالیت آنزیمی است

$U/L = \Delta A/minute \times F$

که F از رابطه‌ی زیر به دست می‌آید

$F = (TV/SV) /(۰/۰۱۸۲۹۰)$

TV= حجم نهایی بر حسب میکرولیتر

SV= حجم نمونه بر حسب میکرولیتر

۰/۰۱۸۲۹۰ =ضریب جذب مولی

فاکتور F را می‌توان به دستگاه اسپکتروفتومتر داد و دستگاه به طور مستقیم مقدار جذب در ۴۱۲ nm را ($\Delta A/min$) به فعالیت (U/L) تبدیل می کند.

IX. مثال

فعالیت PON۱ در ۲۵°C در کووتی با طول ۱ سانتی‌متر با استفاده از روش بالا مورد سنجش قرار گرفت. تغییر در جذب هر ۲۰ ثانیه و تا ۲ دقیقه ثبت شد.

$F \times \Delta A/minute = U/L$

جذب اولیه=۰/۰

جذب پایانی= ۰/۶

$\Delta A/min$=۰/۳

فعالیت پاراکسوناز ۱ (U/L)=

(۰/۳)×(۱۰۲۵/۲۵)/(۰/۰۱۸۲۹۹۰) = ۶۷۲/۴

توجه: نتایج برای نمونه رقیق شده باید در فاکتور رقت ضرب شود.

هشدار: در حین انجام آزمایش از دستکش و ماسک استفاده کنید.

X. منابع

۱. Mackness B, Mackness M, Aviram M., Paragh G. The Paraoxonases: Their Role in Disease Development and Xenobiotic Metabolism. Dordrecht; Netherland, Springer, 2008:3-260.
۲. Bełtowski J, Wójcicka G, Jamroz A. Leptin decreases plasma paraoxonase 1 (PON1) activity and induces oxidative stress: the possible novel mechanism for proatherogenic effect of chronic hyperleptinemia. Atherosclerosis 2003;170(1):21-9.

Taligene Pars