

过氧化氢酶(CAT)检测试剂盒(紫外微板法)

产品简介:

过氧化氢酶(Catalase, CAT)又称触酶, 是一类以铁卟啉为辅基的结合酶, 由四个相同亚单位组成的四聚体酶, 共含 4 分子的亚铁血红素作为辅基, 分子量约为 24KD, CAT 能将细胞代谢产生的毒性物质过氧化氢迅速清除, 可与 GSH-Px 共同保护巯基酶、膜蛋白、过氧化氢解离。

过氧化氢酶(CAT)检测试剂盒(紫外微板法)检测原理是血清或血浆等样品 H_2O_2 在 240nm 处有强烈吸收, 过氧化氢酶能分解过 H_2O_2 , 使待测溶液吸光度随反应时间而减少, 通过紫外酶标仪测定 240nm 处吸光度, 根据测定吸光度的变化速度即可测出过氧化氢酶的活性, 主要用于测定植物组织、血清、血浆等样本中过氧化氢酶的活性, 紫外法又称紫外分光光度计法或紫外吸收法, 该酶的检测对于研究植物代谢强度及抗旱、抗病能力有一定的价值。该试剂盒仅用于科研领域, 不适用于临床诊断或其他用途。

产品组成:

名称	编号	BN27825 100T	Storage
试剂(A): H_2O_2 基液		2×1ml	4°C 避光
试剂(B): CAT Assay Buffer(2.5×)		2×250ml	4°C
使用说明书		1 份	

自备材料:

- 1、蒸馏水、生理盐水
- 2、研钵或匀浆器、离心管、离心机、水浴锅或恒温箱、96 孔 UV 板、全波长酶标仪

操作步骤(仅供参考):

- 1、配制 CAT Assay Buffer 工作液: 按 CAT Assay Buffer(2.5×): 蒸馏水=1: 1.5 的比例稀释, 即获得 CAT Assay Buffer 工作液, 4°C 预冷待用。
- 2、配制 100mM H_2O_2 基液: 该试剂盒提供的 H_2O_2 基液中的 H_2O_2 浓度约为 1M, 由于过氧化氢不是非常稳定, 使用前需自行测定过氧化氢的实际浓度, 把浓度约为 1M 的 H_2O_2 基液用 CAT Assay Buffer 工作液稀释 100 倍, 使 H_2O_2 浓度约为 10mM; 分光光度计测定 A_{240} (一般情况下新配制的 10mM H_2O_2 基液 A_{240} 在 0.45 左右, 经过 3 个月以后 A_{240} 在 0.42 左右), H_2O_2 浓度(mM)=22.94× A_{240} , 从而计算出该试剂盒提供的 H_2O_2 基液中 H_2O_2 的实际浓度, 然后根据实际的 H_2O_2 浓度, 配制 100mM H_2O_2 基液。

3、准备样品：

①植物、动物样品：取正常或逆境下的新鲜植物组织(或动物组织)，清洗干净，擦干，切碎，迅速称取，按 0.5g 样品：2ml CAT Assay Buffer 工作液的比例，加入预冷的 CAT Assay buffer 工作液后匀浆或研磨，转移至 15ml 离心管，再用 CAT Assay Buffer 工作液冲洗研钵或匀浆器，合并冲洗液至该离心管，补加 CAT Assay Buffer 工作液至 10ml，混匀，4℃冰箱中静置 10min，转移离心管上部的清液至新的离心管，4℃ 1200 r/min 离心 30min，上清液即为过氧化氢酶粗提液，4℃保存备用，用于 CAT 的测定。

②血浆、血清和尿液样品：血浆、血清按照常规方法制备，用生理盐水 10 倍稀释后，可以直接用于本试剂盒的测定，尿液通常也可以直接用于测定，-20℃冻存，亦可 4℃短期保存，用于 CAT 的测定。

③高活性样品：如果样品中含有较高活性的 CAT，可用 CAT Assay Buffer 工作液稀释。

④(选做)样品准备完毕后可以用 BCA 蛋白浓度测定试剂盒测定蛋白浓度，以便于后续计算单位蛋白重量组织或细胞内的 CAT 含量。

4、CAT 加样：取 96 孔板，按照下表设置空白孔、测定孔，溶液应按照顺序依次加入，并注意避免产生气泡；如果样品中的酶活性过高，可以减少样品用量或适当稀释后再进行测定，样品的测定最好设置平行复测孔。

加入物(μl)	空白管	测定孔 I	测定孔 II
CAT Assay Buffer 工作液	120	120	120
待测样品(或提取液)	16	16	16
蒸馏水	80	80	80
单独取空白管煮沸 1min，冷却至 25℃。将其余测定管预热至 25℃。			

5、CAT 测定：加入 100mM H₂O₂ 基液 24μl，每加完一孔立即计时，亦可用排枪同时加样，以避免误差；蒸馏水调零，酶标仪测定 240nm 处各孔吸光度，每隔 1min 读数 1 次，共测 4 次，待全部测定完毕后，计算酶活力。

计算：

CAT 活性单位定义：在 25℃ 1min A₂₄₀ 减少 0.1 的过氧化氢酶量为一个 CAT 酶活力单位。根据酶活性定义，计算出样品中的 CAT 活性。

植物、动物组织中 CAT 活力[U/(g·min)]=(ΔA₂₄₀×V_T×N)/(0.1×V_S×t×W)

血清、血浆、尿液中 CAT 活力[U/(ml·min)]=(ΔA₂₄₀×N)/(0.1×V_S×t)

式中：ΔA₂₄₀=A_{空白}-(A_{测定 I}+A_{测定 II})/2

A_{空白}=空白的吸光度

A_{测定}=待测样品最后比较稳定的吸光度

V_T = 提取酶液总体积(ml)

N = 待测样品检测前的稀释倍数

V_s = 测定时所用样品体积(ml)

t = 加 H_2O_2 基液到最后一次读数的反应时间(min)

W = 样品新鲜质量(g)

0.1 = A_{240} 下降 0.1 时的一个酶活力单位

注意事项:

- 1、待测样品中不应含有 CAT 抑制剂，同时需避免反复冻融。
- 2、400nm 以下吸光度值的测定应选用石英比色杯或 96 孔 UV 酶标板。
- 3、CAT Assay Buffer 如出现沉淀或絮状物，可用 50℃左右温水助溶，仍有絮状物应弃用。
- 4、完整的红细胞以及未稀释的溶血液中的过氧化氢酶置于 4℃ 1 周仍然很稳定，稀释后的溶血液中 CAT 容易失活。
- 5、尽量避免冰冻样品造成溶血，否则过氧化氢酶活性会下降 10% ~ 15%。
- 6、血清样品室温下 3 天内活性下降 64.7%，4℃下下降 10.5%，-20℃保存 30 天活性仅下降 3.5%，因此待测样品均应-20℃或-70℃保存。
- 7、为了您的安全和健康，请穿实验服并戴一次性手套操作。
- 8、试剂开封后请尽快使用，以防影响后续实验效果。

有效期: 12 个月有效；低温运输，4℃保存。