

过氧化氢酶(CAT)检测试剂盒(钼酸铵微板法)

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(钼酸铵微板法)其检测原理是血清或血浆等样本在最佳酶反应条件下, 反应后剩余的 H_2O_2 与钼酸铵形成稳定的黄色复合物, 其黄色深浅与酶活性成反比, 通过酶标仪测定405nm处吸光度, 该酶的检测对于研究自由基代谢平衡、抗衰老和肿瘤发病机制具有一定的价值, 100T试剂盒可检测46~50个样本。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	ADS071TE0 100T	Storage
试剂(A): H_2O_2 基液	2×1ml	4℃避光
试剂(B): CAT Assay Buffer	100ml	RT
试剂(C): 钼酸铵试剂	1g	RT
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、酶标仪、96孔板

操作步骤(仅供参考)

- 1、配制65mM H_2O_2 基液：本试剂盒提供的 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 基液用本CAT Assay Buffer稀释100倍, 使 H_2O_2 基液中的 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0.4~0.45左右, 经过3个月以后 A_{240} 在0.35~0.4左右), H_2O_2 浓度(mM)= $22.94 \times A_{240}$, 进而计算出本试剂盒提供的 H_2O_2 基液中的 H_2O_2 的实际浓度, 然后再根据实际的过氧化氢浓度, 配制65mM H_2O_2 基液。
- 2、配置MO显色液: 称取0.4g钼酸铵试剂加入到10ml蒸馏水中, 充分溶解即成, MO显色液易出现乳白色样物质, 应弃用, 尽量现用现配, 该试剂盒提供的钼酸铵试剂为过量。

3、准备样品：

- ①细胞或组织样品：取恰当细胞或组织进行裂解，可以采用RIPA裂解液，如有必要可进行适当匀浆，低速离心取上清，-20℃冻存，用于CAT的检测。
- 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测定，不能及时检测可-20℃冻存。
- ③全血样品：收集适量的全血至一抗凝管内，颠倒混匀，取全血冻融一次，用CAT Assay Buffer 1000倍后进行CAT检测。
- ④血液中的红细胞裂解液：用抗凝管收集血液，颠倒混匀，取至少500μl全血4℃ 3000g离心5min，弃上清，沉淀用预冷的生理盐水洗涤3次，用约5倍细胞体积的预冷的去离子水，例如Milli-Q纯水，重悬细胞沉淀，冰浴10min；使用前用CAT Assay Buffer稀释400倍后进行CAT检测。
- ⑤植物样品：准确称取植物材料(果肉或者去叶脉的叶片)0.5g，剪碎，置于4℃预冷的研钵或匀浆器中，加入预冷提取液1ml，低温研磨至匀浆后转移至离心管，用3ml提取液冲洗研钵或匀浆器并转入离心管，加提取液至总体积为5ml；4℃ 10000r/min离心20min，上清液为酶提取液，上清液可用于CAT的检测。提取液配方：无水磷酸氢二钠3.3g+二水磷酸二氢钠0.13g，补水至200ml，完全溶解即为提取液，4℃保存备用。注意：如果CAT酶活性较低，应相应减少提取液的总体积，以便提高CAT酶的浓度。
- ⑥高活性样品：如果样品中含有较高活性的CAT，可以使用CAT Assay Buffer稀释。
- ⑦(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：按照下表设置空白管、自身对照管、测定管，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，样品的测定最好能设置平行管。

加入物(μl)	空白管	自身对照管	测定管
CAT Assay Buffer	10	—	—
待测样品	—	—	10
65mM H ₂ O ₂ 基液(37℃预温 5min)	100	100	100
立即混匀，置于 37℃水浴，准确孵育 60s。			
待测样品	—	10	—
MO 显色液	100	100	100

- 5、CAT测定：蒸馏水调零，酶标仪测定405nm处吸光度，读取各管吸光度(分别记为 A_{空白}、A_{自身对照}、A_{测定})。如果有条件，尽量采用分光光度计测定，以便结果更为准确。

计算

CAT活性单位的定义：在37℃ 1min催化水解1μmol过氧化氢量为一个CAT酶活力单位，根据酶活性定义，计算出样品中的CAT活性。

血清、血浆、尿液中CAT活力计算公式：

$$\text{血清样品CAT活力(U/ml)} = \{(A_{\text{自身对照}} - A_{\text{测定}}) / A_{\text{空白}}\} \times 650 \times N$$

组织、细胞中CAT活力计算公式：

$$\text{组织样品CAT活力(U/mg)} = \{(A_{\text{自身对照}} - A_{\text{测定}}) / A_{\text{空白}}\} \times 650 / \text{待测样品血红蛋白浓度(mg/ml)}$$

式中： $A_{\text{自身对照}}$ = 自身对照的吸光度

$A_{\text{测定}}$ = 待测样品的吸光度

$A_{\text{空白}}$ = 空白的吸光度

N = 待测样品检测前的稀释倍数

植物组织中CAT活力计算公式：

$$\text{植物样品CAT活力(U/g)} = \{(A_{\text{自身对照}} - A_{\text{测定}}) / A_{\text{空白}}\} \times 650 \times N \times V / m$$

式中： $A_{\text{自身对照}}$ = 自身对照的吸光度

$A_{\text{测定}}$ = 待测样品的吸光度

$A_{\text{空白}}$ = 空白的吸光度

N = 待测样品检测前的稀释倍数

V = 提取液总体积(ml)

m = 植物样品的质量(g) = 0.5

注意事项

- 1、该试剂盒亦可用分光光度计进行测定，但检测的样本数相应减少，如果有条件尽量采用分光光度计测定。
- 2、待测样品中不应含有CAT抑制剂，同时需避免反复冻融。
- 3、CAT Assay Buffer如果出现浑浊或絮状物，应弃用。
- 4、MO显色液配置后可4℃稳定两周，如果出现乳白色物质应弃用，最好现用现配。
- 5、对于植物样品研磨处理应迅速，以免CAT酶活下降，同时尽量置于冰浴状态处理；另外本法不推荐用于植物样本CAT的检测，最好采用过氧化氢酶(CAT)检测试剂盒(紫外比色法)。
- 6、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周仍然较稳定，稀释后的溶血液中CAT容易失活。

- 7、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%。
- 8、血清样品室温下3天内活性下降64.7%，4℃条件下下降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。
- 9、为了您的安全和健康，请穿实验服并戴一次性手套操作。

有效期：12个月。低温运输，按要求保存。