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

编号 / 名称	ADS073TE0 100T	Storage
试剂(A): H_2O_2 基液	2×1ml	4℃避光
试剂(B): CAT Assay Buffer(2.5×)	2×250ml	4℃
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

3、离心管、离心机

4、水浴锅或恒温箱

5、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℃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 H_2O_2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)]=($\triangle A_{240}$×V_T×N)/(0.1×V_S×t×W)

血清、血浆、尿液中CAT活力[U/(ml·min)]=(ΔA_{240}×N)/(0.1×V_S×t)

式中：$\Delta A_{240}=A_{空白}-(A_{测定Ⅰ}+A_{测定Ⅱ})/2$

$A_{空白}$=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、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。

3、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。

4、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%。

5、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。

6、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。

7、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，4℃保存。