

过氧化氢酶(CAT)检测试剂盒(紫外比色法)

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(紫外比色法)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 H_2O_2 , 使待测溶液吸光度随反应时间而减少, 通过紫外分光光度计测定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。该试剂盒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, 不宜用于临床诊断或其他用途。

产品组成

名称	编号	ADS074TE0	Storage
		100T	
试剂(A): H_2O_2 基液		5ml	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、低温离心机
- 3、水浴锅或恒温箱、分光光度计、石英比色杯

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: 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A240(一般情况下, 新配制的10mM H_2O_2 基液A240在0.45左右, 经过3个月以后A240在0.42左右), H_2O_2 浓度(mM) = $22.94 \times A_{240}$ 。从而计算出本试剂盒提供的 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℃ 1200r/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：按照下表设置空白管、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，样品的检测最好设置平行复测管。

加入物(ml)	空白管	测定管 I	测定管 II
CAT Assay buffer 工作液	1.5	1.5	1.5
待测样品(或提取液)	0.2	0.2	0.2
蒸馏水	1.0	1.0	1.0
取空白管煮沸 1min，冷却至 25℃。将测定管预热至 25℃。			

5、CAT测定：加入100mM H₂O₂基液0.3ml，每加完一管立即计时，并迅速倒入石英比色杯。蒸馏水调零，以分光光度计测定240nm处各管吸光度，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℃ 1minA₂₄₀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。

$$\text{植物、动物组织中 CAT 活力}[U/(g \cdot \text{min})] = (\Delta A_{240} \times V_T \times N) / (0.1 \times V_S \times t \times W)$$

$$\text{血清、血浆、尿液中 CAT 活力}[U/(ml \cdot \text{min})] = (\Delta A_{240} \times N) / (0.1 \times V_S \times t)$$

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

$$A_{\text{空白}} = \text{空白的吸光度}$$

$A_{\text{测定}}$ = 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。
- 3、CAT Assay buffer如出现沉淀或絮状物，可用50°C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°C一周仍然很稳定，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°C条件下下降10.5%，-20°C保存30天活性仅下降3.5%。因此，待测样品均应-20°C或-70°C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。

有效期：12个月。低温运输，4°C保存。