



过氧化氢酶(CAT)检测试剂盒(紫外微板法)

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。

组成:

名称 \ 编号	R30337	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℃
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℃预冷待用。

2、配制100mM H₂O₂基液: 该试剂盒提供的H₂O₂ 基液中的 H₂O₂ 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 H₂O₂ 基液用CAT Assay Buffer 工作液稀释100倍, 使H₂O₂ 浓度约为10mM; 分光光度计 测定A₂₄₀(一般情况下新配制的10mM H₂O₂基液 A₂₄₀在0.45左右, 经过3个月以后 A₂₄₀在0.42左右), H₂O₂ 浓度(mM)=22.94×A₂₄₀. 从而计算出该试剂盒提供的H₂O₂ 基 液中H₂O₂ 的实际浓度, 然后根据实际的H₂O₂ 浓度, 配制100mM H₂O₂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, 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/(gmin)]= $(\Delta A_{240} \times VT \times N) / (0.1 \times Vs \times t \times W)$

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

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

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

VT=提取酶液总体积(ml)

N= 待测样品检测前的稀释倍数 Vs=测定时所用样品体积(ml)

t=加 H₂O₂ 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=A₂₄₀ 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。



上海源叶生物科技有限公司
Shanghai yuanye Bio-Technology Co., Ltd
电话: 021-61312973 传真: 021-55068248
网址: www.shyuanye.com
邮箱: shyysw@sina.com

- 2、400nm 以下吸光度值的测定应选用石英比色杯或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3天内室温下活性下降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。

源叶