



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

过氧化氢酶(CAT)检测试剂盒(钼酸铵微板法)

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。

源叶生物 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。

组成:

名称 \ 编号	R22072 100T	Storage
试剂(A): H_2O_2 基液	2×1ml	4℃
试剂(B): CAT Assay Buffer	100ml	4℃ 避光
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、酶标仪、96 孔板

操作步骤(仅供参考):



1、配制 65mM H₂O₂ 基液: 本试剂盒提供的 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 基液用本 CAT Assay Buffer 稀释 100 倍, 使 H₂O₂ 基液中的 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 0.4~0.45 左右, 经过 3 个月以后 A₂₄₀ 在 0.35~0.4 左右), H₂O₂ 浓度(mM)=22.94×A₂₄₀, 进而计算出本试剂盒提供的 H₂O₂ 基液中的 H₂O₂ 的实际浓度, 然后再根据实际的过氧化氢浓度, 配制 65mM H₂O₂ 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, 溶液应按照规定顺序依次加入, 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:

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



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

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:

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℃



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

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 个月有效；常温运输，4℃保存。

