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:

编号 / 名称	GCTE0740 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×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 65mMH_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_2O_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:

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

组织、细胞中 CAT 活力计算公式:

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

式中：$A_{自身对照}$=自身对照的吸光度

$A_{测定}$=待测样品的吸光度

$A_{空白}$=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)= $\{(A_{自身对照}-A_{测定})/A_{空白}\}$ ×650×N×V/m

式中：$A_{自身对照}$=自身对照的吸光度

$A_{测定}$=待测样品的吸光度

$A_{空白}$=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。

10、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，按要求保存。

相关产品：

产品编号	产品名称
GCDC0032	Masson 三色染色液
GCDM0007	瑞氏-姬姆萨复合染色液
GCDP0013	GUS 染色液(即用型)
GCDZ2011	环保浸蜡脱蜡透明液
GCPW0053	Western 抗体洗脱液(碱性)
GCTC0699	植物总糖和还原糖检测试剂盒(DNS 比色法)
GCTC1167	尿素(Urea)检测试剂盒(脲酶波氏比色法)