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	GCTE0742 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、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 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 A_{240} 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)]=($\triangle A_{240}\times V_T\times N$)/($0.1\times V_S\times t\times W$)

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

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

$A_{空白}$=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、 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。

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。

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。

相关产品:

产品编号	产品名称
GCCA0005	氨苄青霉素溶液(Ampicillin,50mg/ml)
GCDH0006	苏木素伊红(HE)染色液(醇溶)
GCDP0013	GUS 染色液(即用型)
GCDZ2011	环保浸蜡脱蜡透明液
GCNR0003	Lezol(总 RNA 提取试剂)
GCPE0018	SDS-PAGE 凝胶配制试剂盒
GCTO1013	丙二醛(MDA)检测试剂盒(TBA 比色法)