

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。

Leagene 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, 过氧化氢酶能分解过 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	TE0743 100T	Storage
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、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 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)= $22.94 \times A_{240}$ 。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°C 冰箱中静置 10min, 转移离心管上部的清液至新的离心管。4°C 1200 r/min 离心 30min, 上清液即为过氧化氢酶粗提液, 4°C 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°C 冻存, 亦可 4°C 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 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°C。将测定管预热至 25°C。			

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°C 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/(g·min)] = $(\Delta A_{240} \times V_T \times N) / (0.1 \times V_S \times t \times W)$

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

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

$A_{\text{空白}}$ = 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。
- 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°C 保存。

相关产品:

产品编号	产品名称
CA0005	氨苄青霉素溶液(Ampicillin,50mg/ml)
DH0006	苏木素伊红(HE)染色液(醇溶)
DP0013	GUS 染色液(即用型)
DZ2011	环保浸蜡脱蜡透明液
NR0003	Lezol(总 RNA 提取试剂)
PE0018	SDS-PAGE 凝胶配制试剂盒
TO1013	丙二醛(MDA)检测试剂盒(TBA 比色法)