

过氧化氢酶(CAT)检测试剂盒(紫外微板法)说明书

本产品仅供体外研究使用，不得用于临床诊断

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 H₂O₂ 在 240nm 处有强烈吸收，过氧化氢酶能分解过 H₂O₂，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：

名称	规格	保存温度
过氧化氢酶(CAT)检测试剂盒	100T	4℃
试剂(A):H ₂ O ₂ 基液	2×1ml	4℃
试剂(B):CAT Assay buffer(2.5×)	2×250ml	4℃
使用说明书	1 份	
有效期	1 年	

自备材料：

- 1、蒸馏水、生理盐水
- 2、研钵或匀浆器
- 3、离心管、离心机
- 4、水浴锅或恒温箱
- 5、96 孔板、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 100mMH₂O₂ 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 CATAssayBuffer 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 10mMH₂O₂ 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 100mMH₂O₂ 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：2mlCATAssayBuffer 工作液的比例，加入预冷的 CATAssaybuffer 工作液后匀浆或研磨，转移至 15ml 离心管，再用 CATAssayBuffer 工作液冲洗研钵或匀浆器，合并冲洗液至该离心管，补加 CATAssayBuffer 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℃1200r/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 CATAssayBuffer 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(ml)	空白管	测定管 I	测定管 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 100mMH₂O₂ 基液 24 μl，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℃1minA₂₄₀ 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)]=($\Delta A_{240} \times VT \times N$)/(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= 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、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。
- 3、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。
- 4、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%。
- 5、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。
- 6、为了您的安全和健康，请穿实验服并戴一次性手套操作。

相关产品:

植物过氧化物酶(POD)
碱性磷酸酶(ALP)
碱性磷酸酶同工酶检测试剂盒(抑制敏感法)
纤维素酶检测试剂盒(DNS 微板法)
苯丙氨酸解氨酶(PAL)
辅酶 Q10(CoQ10)