

## 过氧化氢酶（CAT）检测试剂盒（钼酸铵微板法）

产品货号：BA1598

产品规格：100T

### 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, 不宜用于临床诊断或其他用途。

### 产品内容:

试剂名称	100T	保存条件
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	室温

### 需自备的仪器和用品:

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  $H_2O_2$ 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65mM $H_2O_2$ 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。本产品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500 $\mu$ l全血4℃ 3000g离心5min, 弃上清,



扫一扫 加微信

上海尚宝生物科技有限公司

Shanghai Saint-Bio Biotechnology Co., Ltd

地址: 上海市徐汇区龙华路2518弄14号

电话: 400-611-0007 13671551480

Q Q: 807961520

邮箱: saintbio@126.com

http://www.saint-bio.com

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 <sub>2</sub> O <sub>2</sub> 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<sub>空白</sub>、A<sub>自身对照</sub>、A<sub>测定</sub>)。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：

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

组织、细胞中CAT活力计算公式：

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

式中：A<sub>自身对照</sub> = 自身对照的吸光度

A<sub>测定</sub> = 待测样品的吸光度

A<sub>空白</sub> = 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：

$$\text{植物样品CAT活力(U/g)} = \left\{ \frac{A_{\text{自身对照}} - A_{\text{测定}}}{A_{\text{空白}}} \right\} \times 650 \times N \times V/m$$

式中：A<sub>自身对照</sub> = 自身对照的吸光度

A<sub>测定</sub> = 待测样品的吸光度

A<sub>空白</sub> = 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



扫一扫 加微信

上海尚宝生物科技有限公司

Shanghai Saint-Bio Biotechnology Co.,Ltd

地址：上海市徐汇区龙华路2518弄14号

电话：400-611-0007 13671551480

Q Q：807961520

邮箱：saintbio@126.com

http://www.saint-bio.com

**注意事项:**

1. 本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℃一周仍然较稳定，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。

**有效期:** 12个月有效。常温运输，4℃保存。



扫一扫 加微信

**上海尚宝生物科技有限公司**

Shanghai Saint-Bio Biotechnology Co.,Ltd

地址:上海市徐汇区龙华路2518弄14号

电话:400-611-0007 13671551480

Q Q: 807961520

邮箱: saintbio@126.com

<http://www.saint-bio.com>