

过氧化氢酶 (CAT) 活性检测试剂盒 (钼酸铵可见分光光度法)

产品货号: BA2143

产品规格: 50T/24S

产品简介:

CAT(EC1.11.1.6)广泛存在于动物、植物、微生物和培养细胞中,是最主要的H₂O₂清除酶,在活性氧清除系统中具有重要作用。

H₂O₂可与钼酸铵反应形成稳定的黄色复合物,在405nm处有强烈吸收峰,且其吸光值大小与过氧化氢浓度成正比。通过测定反应体系中剩余的H₂O₂量,得出被CAT催化分解的H₂O₂量,进而反映CAT的活性。

注意: 实验之前建议选择2-3个预期差异大的样本做预实验。

产品组成:

试剂名称	规格	保存条件
提取液	液体50mL×1瓶	2-8℃
试剂一	液体25mL×1瓶	2-8℃
试剂二	粉剂×2瓶	2-8℃
标准品	液体0.5mL×1瓶	2-8℃

溶液的配制:

1. 试剂二: 临用前取1瓶试剂二加入17.5mL蒸馏水,充分溶解,用不完的试剂2-8℃保存一周。
2. 20μmol/mL标准品的配制: 标准品置于试剂瓶内EP管中,使用前需先离心。本试剂盒所提供标准品为1mmol/mL H₂O₂标准品,临用前根据样本量按照标准品:试剂一=20μL:980μL(1000μL,可做3次标准管或3个测定管)的比例配制,充分混匀,即为20μmol/mL标准品,现配现用。

需自备的仪器和用品:

可见分光光度计、台式离心机、可调式移液器、恒温水浴锅、1mL玻璃比色皿、研钵/匀浆器/细胞超声破碎仪、冰和蒸馏水。

操作步骤:

一、样本处理 (可适当调整待测样本量,具体比例可以参考文献)

1. 细菌、细胞或组织样本的制备:
 - 1) 细菌或培养细胞: 收集细菌或细胞到离心管内,离心后弃上清;按照每500万细菌或细胞加入1mL提取液,超声波破碎细菌或细胞(功率200W,超声3s,间隔9s,重复30次);8000g,4℃离心10min,取上清,置冰上待测。
 - 2) 组织: 按照组织质量(g):提取液体积(V)=1:5~10(建议称取约0.1g组织,加入1mL提取液)进行冰浴匀浆。8000g,4℃离心10min,取上清,置冰上待测。
2. 血清(浆)样本: 直接检测。

二、测定步骤

1. 分光光度计预热30min以上,调节波长至405nm,蒸馏水调零。
2. 测定前将20μmol/mL标准品与试剂一在25℃水浴10min以上。
3. 加样表:



扫一扫 加微信

郑州乐业生物科技有限公司

Zhengzhou Leye-Bio Biotechnology Co.,Ltd

地址:郑州市高新区红松路36号龙鼎企业中心一期1号楼5楼25号

免费电话: 400-611-0007 13671551480 13643719799

Q Q: 807961520 731791866

邮箱: zzlybio@126.com

试剂名称 (μL)	测定管	对照管	空白管	标准管
样本	60	60	-	-
提取液	-	-	60	60
20μmol/mL 标准品	300	-	-	300
试剂一	-	300	300	-
混匀, 25°C水浴锅中准确反应 10min。				
试剂二	540	540	540	540
混匀, 室温静置 10min, 于 1mL 玻璃比色皿中测定 405nm 处吸光值, 分别记为 A 测定、A 对照、A 空白、A 标准。计算 $\Delta A_{测定} = A_{测定} - A_{对照}$, $\Delta A_{标准} = A_{标准} - A_{空白}$, $\Delta A = \Delta A_{标准} - A_{测定}$ 。空白管和标准管只需做 1-2 次。				

三、CAT 活性计算

1. 血清(浆)CAT 活力的计算:

单位的定义: 在 25°C 条件下, 每 mL 血清(浆)每分钟催化 1μmol H₂O₂ 降解定义为一个酶活力单位。

$$CAT(U/mL) = (A \div \Delta A_{标准}) \times 20 \times V_{标准} \div V_{样} \div T \times F = 10 \times (\Delta A \div \Delta A_{标准}) \times F$$

2. 组织、细菌或细胞中 CAT 活力计算

1) 按样本蛋白浓度计算:

单位的定义: 在 25°C 条件下, 每 mg 组织蛋白每分钟催化 1μmol H₂O₂ 降解定义为一个酶活力单位。

$$CAT(U/mg \text{ prot}) = (\Delta A \div \Delta A_{标准}) \times 20 \times V_{标准} \div (C_{pr} \times V_{样}) \div T \times F = 10 \times (\Delta A \div \Delta A_{标准}) \div C_{pr} \times F$$

2) 按样本质量计算:

单位的定义: 在 25°C 条件下, 每 g 组织每分钟催化 1μmol H₂O₂ 降解定义为一个酶活力单位。

$$CAT(U/g \text{ 质量}) = (\Delta A \div \Delta A_{标准}) \times 20 \times V_{标准} \div (V_{样} \div V_{样总} \times W) \div T \times F = 10 \times (\Delta A \div \Delta A_{标准}) \div W \times F$$

3) 按细菌或细胞数量计算:

单位的定义: 在 25°C 条件下, 每 1 万个细菌或细胞每分钟催化 1μmol H₂O₂ 降解定义为一个酶活力单位。

$$CAT(U/10^4 \text{ cell}) = (\Delta A \div \Delta A_{标准}) \times 20 \times V_{标准} \div (V_{样} \div V_{样总} \times 500) \div T \times F = 0.03 \times (\Delta A \div \Delta A_{标准}) \times F$$

30: 标准品浓度, 30μmol/mL; V 标准: 加入标准品体积, 0.3mL; V 样: 加入样本体积, 0.06mL; T: 反应时间, 10min; F: 样本稀释倍数; C_{pr}: 样本蛋白质浓度, mg/mL; V 样总: 加入提取液体积, 1mL; W: 样本质量, g; 500: 细胞或细菌总数, 500 万。

注意事项:

1. 本试剂盒多给出 25mL 的提取液, 供样本稀释使用。
2. 如果反应液有大量气泡产生, 将样本用提取液稀释后再进行测定。
3. 如果样本量过多, 为保证反应时间(25°C, 10min)的准确性, 建议分成若干批次检测, 每批次检测均需配 1-2 个空白管与标准管。
4. 当 A 测定小于 0.12 或者约等于 A 对照时, 建议将样本用提取液稀释后再进行测定。
5. 动物组织如肝脏、肾脏等酶活性较高样本, 预实验建议将样本用提取液多个高倍稀释(如 25 倍、50 倍、100 倍等)试验后, 再进行检测。



扫一扫 加微信

郑州乐业生物科技有限公司

Zhengzhou Leye-Bio Biotechnology Co., Ltd

地址: 郑州市高新区红松路36号龙鼎企业中心一期1号楼5楼25号

免费电话: 400-611-0007 13671551480 13643719799

Q Q: 807961520 731791866

邮箱: zzlybio@126.com