

过氧化氢酶 CAT 酶活性检测试剂盒 (比色法) E2030

产品简介

过氧化氢酶检测试剂盒 (Catalase Assay Kit) 是一种特异灵敏的检测过氧化氢酶 (Catalase) 酶活力的试剂盒。Catalase 是一种广泛存在于需氧细胞内的抗氧化酶, 通过催化过氧化氢 (H_2O_2) 分解为氧气和水, 降低生理和病理状态下产生的活性氧对细胞的损伤。

本试剂盒利用 Catalase 催化 H_2O_2 分解, 然后利用过氧化物酶 (Peroxidase) 催化剩余 H_2O_2 与 OxiRed 探针反应生成可以通过比色法或荧光法检测到的产物, 从而定量分析 Catalase 酶活力。

本试剂盒通过比色法 (OD570nm) 检测 Catalase 的线性范围为 0.001-0.01U/ml, 灵敏度 \leq 0.001U/ml; 通过荧光法 (ex535nm-em587nm) 检测 Catalase 的线性范围为 0.0001-0.001U/ml, 灵敏度 \leq 0.0001U/ml。

本试剂盒能够检测细胞培养上清、细胞裂解上清、组织裂解上清、血浆和血清中的 Catalase 酶活力。

试剂盒组成

组份名称	规格
Lysis Buffer	50 ml/瓶
Catalase Assay Buffer	25 ml/瓶
H_2O_2 Solution (0.88M)	0.5 ml/管
OxiRed Solution	60 μ l/管
Peroxidase	60 μ l/管
Catalase	60 μ l/管

需要而未提供的试剂及器材

1. 超纯水
2. 系列可调节量程移液器及吸头
3. 离心管、透明 (比色法) 或黑色 (荧光法) 96 孔板
4. 多功能酶标仪

储存条件

-20 $^{\circ}$ C 储存, 有效期 12 个月。

注意事项

1. 初次使用试剂盒时, 小体积液体试剂请适当离心后使用。
2. 实验过程中, 除裂解液、检测缓冲液和过氧化氢溶液外, 其它试剂请置于冰上。
3. 严格控制反应的温度和反应时间, 样品中酶活力过低时, 可适当延长反应时间。

4. H₂O₂ 标准曲线和 Catalase 对照只需测定 1 次即可。
5. 本产品仅限专业人员用于科学研究, 不得用于临床诊断或治疗, 不得用于食品或药品。

测定前准备

1. 样品的准备

- 1.1 细胞培养上清的准备: 将需要测定的细胞接种到培养板中, 经过干预因素处理后, 直接吸取细胞上清, 如果是悬浮细胞, 4℃、300g 离心 5 分钟, 收集上清。
- 1.2 细胞裂解上清的准备: 将需要测定的细胞 (1×10⁶-1×10⁷) 收集到 2ml 的离心管中, 4℃、300g 离心 5 分钟, 弃去上清, 然后加入 200μl 的 Lysis Buffer, 冰浴裂解 30min, 4℃、10000g 离心 10 分钟, 收集上清。
- 1.3 组织裂解上清的准备: 将需要测定的组织 (20-50mg) 收集到玻璃匀浆器或自动匀浆管中, 然后加入 0.5ml 的 Lysis Buffer, 匀浆 1min, 4℃、10000g 离心 10 分钟, 收集上清。
- 1.4 血浆样品的准备: 取新鲜抗凝血液, 4℃、1000g 离心 10 分钟, 上清为血浆。
- 1.5 血清样品的准备: 取新鲜血液, 室温凝固 30min, 4℃、1000g 离心 10 分钟, 上清为血清。

2. 试剂盒的准备

Catalase 检测工作液的配制: 根据待测样品数参考下表配制适量的 Catalase 检测工作液, 表中试剂按比例混合后即为 Catalase 检测工作液。

	1 个样品	10 个样品	50 个样品
Catalase Assay Buffer	49 μl	0.49 ml	2.45 ml
OxiRed Solution	0.5 μl	5 μl	25 μl
Peroxidase	0.5 μl	20 μl	25 μl

3. 标准品的准备

比色法标准品的准备: 在 1.5ml 离心管中, 加入 870μl Catalase Assay Buffer, 取 10μl 的 0.88M 浓度 H₂O₂ 标准品加入离心管中配制 10mM 浓度 H₂O₂ 标准品; 然后取另一 1.5ml 离心管, 加入 980μl Catalase Assay Buffer, 取 20μl 的 10mM 浓度 H₂O₂ 标准品加入离心管中配制 200μM 浓度 H₂O₂ 标准品; 另外 6 根 1.5ml 离心管, 分别加入 500μl Catalase Assay Buffer, 再吸取 500μl 的 200μM 浓度 H₂O₂ 标准品依次倍倍稀释为 100、50、25、12.5、6.25、3.12μM 浓度。

荧光法标准品的准备: 在 1.5ml 离心管中, 加入 870μl Catalase Assay Buffer, 取 10μl 的 0.88M 浓度 H₂O₂ 标准品加入离心管中配制 10mM 浓度 H₂O₂ 标准品; 然后取另一 1.5ml 离心管, 加入 990μl Catalase Assay Buffer, 取 10μl 的 10mM 浓度 H₂O₂ 标准品加入离心管中配制 100μM 浓度 H₂O₂ 标准品; 再取另一 1.5ml 离心管, 加入 800μl Catalase Assay Buffer, 取 200μl 的 100μM 浓度 H₂O₂ 标准品加入离心管中配制 20μM 浓度 H₂O₂ 标准品; 另外 6 根 1.5 ml 离心管, 分别加入 500μl Catalase Assay Buffer, 再吸取 500μl 的 20μM 浓度 H₂O₂ 标准品依次倍倍稀释为 10、5、2.5、1.25、0.625、0.312μM 浓度。

测定方法

1. H₂O₂ 标准曲线测定: 利用上述系列浓度 H₂O₂ 标准品, 参考下表, 测定 H₂O₂ 标准曲线。

	空白对照	标准品
Lysis Buffer	50 μ l	50 μ l
Catalase Assay Buffer	50 μ l	—
H ₂ O ₂ 标准品	—	50 μ l
Catalase 检测工作液	50 μ l	50 μ l
25 $^{\circ}$ C 孵育	1 min	1 min

注: 在上述反应体系中, 比色法测定中 H₂O₂ 标准品加入 96 孔板中的量分别为 10、5、2.5、1.25、0.625、0.312、0.156 nmol。荧光法测定中 H₂O₂ 标准品加入 96 孔板中的量分别为 1、0.5、0.25、0.125、0.062、0.031 nmol。

2. 样品测定: 参考下表, 使用透明 (比色法) 或黑色 (荧光法) 96 孔板, 首先加入 Lysis Buffer、Catalase 对照或样品, 然后加入 H₂O₂ Solution, 25 $^{\circ}$ C 反应 10 分钟, 最后加入 Catalase 检测工作液, 25 $^{\circ}$ C 反应 1 分钟。

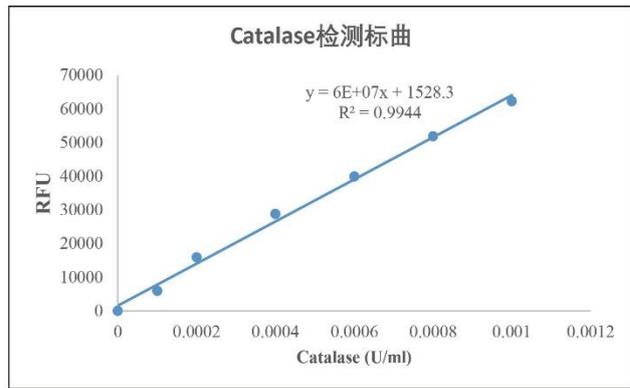
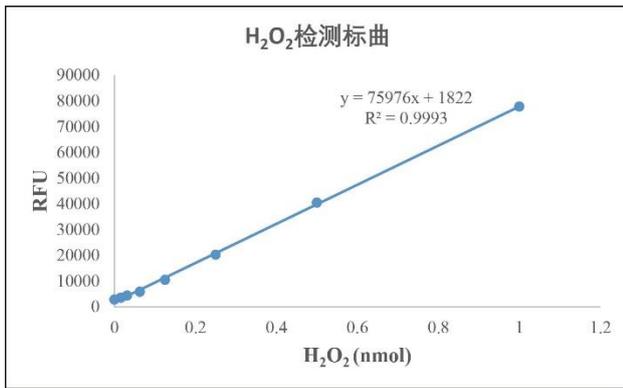
	空白对照孔	H ₂ O ₂ 对照孔	Catalase 对照孔	样品孔
Lysis Buffer	50 μ l	50 μ l	—	—
Catalase 对照	—	—	50 μ l	—
样品	—	—	—	50 μ l
Catalase Assay Buffer	50 μ l	—	—	—
H ₂ O ₂ Solution	—	50 μ l	50 μ l	50 μ l
25 $^{\circ}$ C 孵育	10 min	10 min	10 min	10 min
Catalase 检测工作液	50 μ l	50 μ l	50 μ l	50 μ l
25 $^{\circ}$ C 孵育	1 min	1 min	1 min	1 min

注: 比色法中加入 H₂O₂ Solution 浓度为 200 μ M, 荧光法中加入 H₂O₂ Solution 浓度为 20 μ M; 对于 Catalase 对照孔, 比色法测定中, 利用 Lysis Buffer 将试剂盒中 Catalase 原液稀释 10 倍, 然后加入 Catalase 对照孔 50 μ l; 荧光法测定中, 利用 Lysis Buffer 将试剂盒中 Catalase 原液稀释 100 倍, 然后加入 Catalase 对照孔 50 μ l。

3. 待反应完成后, 比色法利用酶标仪测定 570nm 波长的吸光度, 荧光法测定 ex535nm-em587nm 的荧光值, 当样品中 Catalase 酶活力偏低时, 请选择荧光法测定, 另外可以适当延长加入 H₂O₂ Solution 后 Catalase 催化反应的时间。

数据处理

利用 H₂O₂ 标准品的量为横坐标, 吸光度值或荧光值为纵坐标制作标准曲线, 然后利用样品测定中吸光度值或荧光值, 计算样品中 Catalase 催化分解 H₂O₂ 的量。根据 Catalase 酶活力定义: 在 pH7.0、25 $^{\circ}$ C 条件下每分钟催化 1 μ mol H₂O₂ 分解的 Catalase 酶活力为 1U, 计算样品中 Catalase 酶活力。通过荧光法测定 H₂O₂ 标曲和 Catalase 标曲结果如下图所示:



参考文献

1. L.H. Johansson, L.A. Borg, 1988. A spectrophotometric method for determination of catalase activity in small tissue samples. *Anal. Biochem.* 174(1): 331-336.