

过氧化氢酶 (CAT) 测定试剂盒说明书(精简版)

(货号: A007-2-1 紫外法 100 管/96 样)

免责声明: 测试前请仔细阅读说明书, 预试后再进行批量实验,

0.5~0.55。

否则由此导致的后果用户自行承担!

五、操作步骤:

1、样本前处理:

①、溶血液的制备:

取新鲜全血 50 μ L 加双蒸水至 2.5mL 混匀配成 1:49 溶血液。

②、1%肝组织匀浆的制备:

按《实验方法学》制备 10% 肝组织匀浆, 再取部分 10% 肝组织匀浆, 用生理盐水按 1:9 稀释制备成 1% 肝组织匀浆。

注: 如果样本(脑组织、神经组织等)的 CAT 活力太低, 可以加大样本浓度或增加取样量, 本试剂盒不推荐除肝脏外的其它组织测定, 其它组织(包括肝脏)可用 A007-1-1(钼酸铵法)测定。

2、测定过程:

取 1cm 光径石英比色皿, 紫外 240nm, 双蒸水调零备用。取经过前处理的样本 0.02mL 加入比色皿底部, 将已预温至 25 $^{\circ}$ C, OD 在 0.5~0.55 之间的底物溶液 3mL 直接用 5mL 或 10mL 的大移液器快速冲入比色皿中, 240nm 处立即测定吸光度, 记下 A₁ 值, 比色皿不要取出, 1 分钟时立即再测一次吸光度, 记下 A₂ 值。(没有大移液器可用滴管或细玻璃棒快速混匀 1~2 次)

六、计算及举例:

(一)、全血样本中 CAT 测定:

1、样本前处理: 取全血(全血取之前缓慢颠倒混匀)按 1:49(或 1:99)的比例加蒸馏水混合, 涡旋混匀, 制备成溶血液待测。

2、单位定义:

每克血红蛋白中过氧化氢酶(CAT)每秒钟分解吸光度为 0.50~0.55 的底物中的过氧化氢相对量为一个过氧化氢酶的活力单位。

3、计算公式:

$$\text{CAT 活力 (U/gHb)} = \log \frac{A_1}{A_2} \times \frac{2.303}{60} \times N_1 \times N_2 \div \text{CHb}$$

注: 浓度与吸光度成正相关, A₁ 为 240nm 处零时刻吸光度, A₂ 为 240nm 处 1 分钟时刻吸光度; 2.303 为从自然对数换算成常用对数 log 时必须乘以 2.303; N₁ 为样本测试前稀释倍数; N₂ 为反应体系稀释倍数=反应总体积(3.02mL)/取样量(0.02mL); CHb 为样本血红蛋白浓度, gHb/L。

(二)、组织样本中 CAT 测定: (适用于肝脏样本测定)

1、样本前处理: 准确称取组织约 0.05g, 按重量(g): 体积(mL)为 1:9 的比例加入生理盐水, 冰水浴匀浆, 4000 转/分离心 10 分钟, 取匀浆上清液(10% 匀浆液)待测。(可根据预实验结果(A₁-A₂ 值在 0.02-0.2 范围内)选择适宜的匀浆液浓度)

2、单位定义:

每克组织蛋白中过氧化氢酶(CAT)每秒钟分解吸光度为 0.50~0.55 的底物中的过氧化氢相对量为一个过氧化氢酶的活力单位。

3、计算公式:

$$\text{CAT 活力 (U/gprot)} = \log \frac{A_1}{A_2} \times \frac{2.303}{60} \times N_1 \times N_2 \div \text{Cpr}$$

注: 浓度与吸光度成正相关, A₁ 为 240nm 处零时刻吸光度, A₂ 为 240nm 处 1 分钟时刻吸光度; 2.303 为从自然对数换算成常用对数 log 时必须乘以 2.303; N₁ 为样本测试前稀释倍数; N₂ 为反应体系

一、测定意义:

氢氧自由基(OH \cdot)是化学性质最活泼的活性氧, 它几乎与细胞内的每一类有机物如糖、氨基酸、磷脂、核苷酸和有机酸等都能反应, 并且有非常高的速度常数, 因此它的破坏性极强, 但它可以被过氧化氢酶分解, 因而测定过氧化氢酶的高低就有其重要意义。

二、测定原理:

红细胞或组织中过氧化氢酶(Catalase)在一定条件下能直接分解其底物过氧化氢(H₂O₂), 使 H₂O₂ 在反应液中的浓度逐渐降低, 相应的吸光度也逐渐下降。

三、试剂组成与配制: (试剂盒有效期 6 个月)

试剂一: 30mL 水剂贮备液 \times 1 瓶, 4 $^{\circ}$ C 保存。

试剂二: 甲粉 \times 1 瓶, 乙粉 \times 1 瓶, 4 $^{\circ}$ C 保存。用时各加双蒸水 200mL, 完全溶解后混合, 再用双蒸水定容至 500mL, 配成试剂二应用液, 4 $^{\circ}$ C 可保存 3 个月。

四、所需仪器耗材及试剂:

含 240nm 波长的紫外分光光度计及 1cm 光径石英比色皿、37 $^{\circ}$ C 水浴锅、台式低速离心机、各种规格移液器、双蒸水、生理盐水(0.9%)或 PBS(0.1M)、涡旋混匀器、离心管、蛋白测定试剂(组织样本用, 本公司有售)、血红蛋白测定试剂(全血用, 本公司有售)。

五、底物溶液的配制:

1、每次测定前先配制底物溶液, 使其吸光度 A 在 0.5~0.55(1cm 光径)之间, 并将底物溶液预温至 25 $^{\circ}$ C 备用, 具体配法如下:

①、取试剂一 1~2mL 加 10 倍试剂二应用液, 混匀, 紫外 240nm 处, 双蒸水调零, 1cm 光径石英比色皿测吸光度 A(OD)值, 若在 0.5~0.55 之间, 可预温至 25 $^{\circ}$ C 进行测试。

②、若吸光度大于 0.55, 则将比色杯中溶液倒回已配制的底物溶液中, 加试剂二应用液进行稀释, 所需试剂二应用液体积为 X mL 按下公式计算。

$$X(\text{mL}) = \left(\frac{A_{\text{底物溶液}}}{0.55} - 1 \right) \times \text{已加入的试剂二应用液体积}$$

举例: 取试剂一 2mL 加试剂二应用液 20mL 配制的底物溶液的吸光度为 1.09, 则应再加试剂二应用液体积 X mL 稀释:

$$X(\text{mL}) = \left(\frac{1.09}{0.55} - 1 \right) \times 20 = 19.64(\text{mL})$$

③、若测得的吸光度小于 0.5, 如只有 0.35, 则将比色皿中溶液倒回已配制的底物溶液中, 加提高吸光度, 所需量 X mL 按下公式计算:

$$X(\text{mL}) = \left(1 - \frac{A_{\text{底物溶液}}}{0.55} \right) \times \text{已加入的试剂一的体积}$$

举例: 取试剂一 2mL 加试剂二应用液 20mL 配制的底物溶液的吸光度为 0.35, 则应再加试剂一的量为:

$$X(\text{mL}) = \left(1 - \frac{0.35}{0.55} \right) \times 2 = 0.6\text{mL}$$

2、总结:

若 A_{底物溶液} 在 0.5~0.55 之间, 预温至 25 $^{\circ}$ C 即可测试。

若 A_{底物溶液} 大于 0.55 则用试剂二应用液稀释使 OD 降到 0.5~0.55。

若 A_{底物溶液} 小于 0.5 则用试剂一提高 OD 使其上升至

稀释倍数=反应总体积(3.02mL)/取样量(0.02mL) ;
Cpr 为组织匀浆蛋白浓度, gprot/mL (prot 指蛋白), :
匀浆蛋白浓度可用考马斯亮蓝法或 BCA 法测定,
该试剂盒所有售 (A045-2, A045-3/-4)。

七、注意点:

- 1、为了减少误差, 两只石英比色杯要进行校正。
- 2、每次加样前比色杯要用双蒸水冲洗 2~3 次, 扣干备用。
- 3、每次比色前(加样前)比色杯的透光面要用擦镜纸擦干净。
- 4、比色与计时要同步, 最好为两个人或者用自动生化分析仪。
- 5、加样品量不可太大, 以免产生气泡影响吸光度。
- 6、1:100 的溶血液放置室温下不可超过 2 小时。
- 7、脑组织和神经组织中过氧化氢酶活力非常低, 不推荐用本试剂盒方法测定。
- 8、本试剂盒对于动物肝脏及全血样本测定效果达标, 其它样本(当然也包含动物肝脏及全血样本)推荐用 A007-1-1 (钼酸铵法) 试剂盒测定, 效果较好。