

# 过氧化氢酶（Catalase, CAT）试剂盒说明书

（微板法 196 样）

## 一、产品简介：

过氧化氢酶(CAT, EC 1.11.1.6)普遍存在于植物动物组织中, 其活性与生物体的代谢强度及抗寒、抗病能力有一定关系。本试剂盒提供一种简单, 灵敏, 快速的测定方法, 即 CAT 催化过氧化氢产生水与氧气, 剩余的过氧化氢与一种新型显色探针显色, 其在 510nm 处有最大吸收峰。通过过氧化氢的减少量来计算样本中 CAT 酶的活力。

本试剂盒突出特点是从紫外波长 (240nm: 过氧化氢的检测波长) 转换到可见波长 (510nm) 检测, 无需使用石英比色皿或 UV 板。而且由于过氧化氢极其不稳定, 直接检测造成读值不稳定, 且蛋白质等组分在此紫外波长下也有光吸收, 影响结果精确性。

## 二、试剂盒组分与配制

试剂名称	规格	保存要求	备注
提取液	液体 110mL×1 瓶	4℃保存	用前摇匀, 且用蒸馏水稀释一倍后再使用。
试剂一	液体 100mL×2 瓶	4℃保存	
试剂二	液体×1 支	4℃保存	用前甩几下使试剂落入底部, 分别取出 80μL 至三个新 EP 管中, 再分别加 1.56mL 蒸馏水混匀备用。
试剂三	液体 24mL×1 瓶	4℃保存	
试剂四	液体 60mL×1 瓶	4℃保存	
标准品	液体 1 mL×1 支	4℃保存	若重新做标曲, 则用到该试剂

## 三、所需的仪器和用品：

酶标仪、台式离心机、可调式移液器、96 孔板、研钵、冰和蒸馏水

## 四、过氧化氢酶（CAT）活性测定：

建议正式实验前选取 2 个样本做预测定, 了解本批样品情况, 熟悉实验流程, 避免实验样本和试剂浪费!

### 1、样本制备：

① 组织样本：称取约 0.1g 组织（水分充足的样本可取 0.5g），加入 1mL 提取液，进行冰浴匀浆。4℃×12000rpm 离心 10min，取上清，置冰上待测。

【注】：若增加样本量，可按照组织质量（g）：提取液体积(mL)为 1：5~10 的比例进行提取。

② 细菌/细胞样本：

先收集细菌或细胞到离心管内，离心后弃上清；取约 500 万细菌或细胞加入 1mL 提取液，超声波破碎细菌或细胞（冰浴，功率 200W，超声 3s，间隔 10s，重复 30 次）；12000rpm 4℃离心 10min，取上清，置冰上待测。

【注】：若增加样本量，可按照细菌/细胞数量（10<sup>4</sup>）：提取液（mL）为 500~1000：1 的比例进行提取。

③ 液体样本：直接检测；若浑浊，离心后取上清检测。

### 2、上机检测：

① 酶标仪预热 30min 以上，调节波长至 510nm。

② 试剂二事先按照试剂配制要求配制好，再进行以下操作。

③ 先检测空白管（**仅做一次**）：80μL 试剂一+20μL 试剂二+100μL 试剂三，立即混匀后取 10μL，立即按照第⑥步显色反应依次加样检测。吸光值即为 A 空白。

④ **建议**：由于反应时长是 5min，若一次性待检样本较多，可分批检测样本。

⑤ 在 EP 管中依次加入：

试剂名称 (μL)	测定管
样本	10
试剂一	70
试剂二	20
混匀, (观察有气泡产生, 酶活性越大, 则气泡越多), 室温 25°C 准确反应 5min。	
试剂三	100
混匀后, 立即取 10μL 混合液	

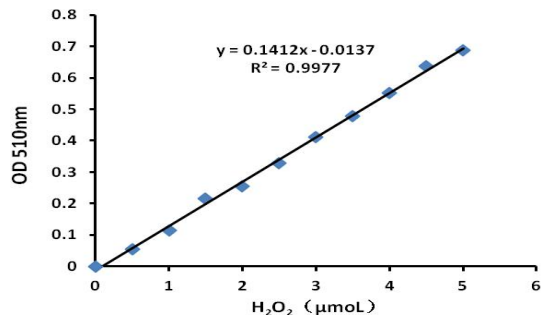
⑥ 显色反应:

试剂名称 (μL)	测定管
混合液	10
试剂一	900
试剂四	290
混匀, 室温 25°C 反应 5min, 取 200μL 转移到 96 孔板中, 510nm 处测定吸光值 A, $\Delta A = A - A_{\text{空白}}$ 测定。	

- 【注】:** 1. 空白管的颜色最深, 若测定管颜色很浅接近无色, 说明样本里面过氧化氢酶活性高, 则可减少样本加样量 V1 (如减至 5μL, 则试剂一相应增加, 保持总体积不变), 或减少反应时间 T (如由 5min 减至 1min)。则改变后的反应时间 T 和加样量 V1 需重新代入公式计算。
2. 若测定管颜色与空白管颜色接近, 即  $\Delta A$  在零附近, 说明样本里面过氧化氢酶活性低, 则可增加样本加样量 V1 (如增至 50μL, 则试剂一相应减少, 保持总体积不变), 或增加反应时间 T (如由 5min 增至 10min 或更长)。则改变后的反应时间 T 和加样量 V1 需重新代入公式计算。

## 五、结果计算:

1、标准曲线:  $y = 0.1412x - 0.0137$ : x 为  $H_2O_2$  标准品浓度(μmol), y 为  $\Delta A$ 。



2、按样本鲜重计算:

酶活定义: 在 25°C, 每克组织每分钟催化分解 1μmol  $H_2O_2$  定义为一个酶活单位 (U)。

$$CAT(\mu\text{mol}/\text{min}/\text{g 鲜重}) = [(\Delta A + 0.0137) \div 0.1412] \div (W \times V1 \div V) \div T = 141.6 \times (\Delta A + 0.0137) \div W$$

3、按样本蛋白浓度计算:

酶活定义: 在 25°C, 每毫克组织蛋白每分钟催化分解 1μmol  $H_2O_2$  定义为一个酶活单位 (U)。

$$CAT(\mu\text{mol}/\text{min}/\text{mg prot}) = [(\Delta A + 0.0137) \div 0.1412] \div (V1 \times Cpr) \div T = 141.6 \times (\Delta A + 0.0137) \div Cpr$$

4、按细胞数量计算:

酶活定义: 在 25°C, 每 10<sup>4</sup> 个细胞每分钟催化分解 1μmol  $H_2O_2$  定义为一个酶活单位 (U)。

$$CAT \text{ 酶活}(\mu\text{mol}/\text{min}/10^4 \text{ cell}) = [(\Delta A + 0.0137) \div 0.1412] \div (500 \times V1 \div V) \div T = 0.283 \times (\Delta A + 0.0137)$$

5、按照液体体积计算:

酶活定义: 在 25°C, 每毫升液体每分钟催化分解 1μmol  $H_2O_2$  定义为一个酶活单位 (U)。

$$CAT(\mu\text{mol}/\text{min}/\text{mL}) = [(\Delta A + 0.0137) \div 0.1412] \div V1 \div T = 141.6 \times (\Delta A + 0.0137)$$

---

V---加入提取液体积, 1 mL;

V1---加入样本体积, 0.01mL;

T---反应时间, 5min;

W---样本质量, g;

500---细胞数量

Cpr---样本蛋白质浓度, mg/mL, 建议使用本公司的 BCA 蛋白含量检测试剂盒。

附: 标准曲线制作过程:

- 1 制备标准品母液 (250mM):
- 2 把母液稀释成以下浓度梯度的标准品: 0, 50, 100, 150, 200, 250mM。也可根据实际样本来调整标准品浓度。
- 3 20 $\mu$ L 标准品+80 $\mu$ L 试剂一+100 $\mu$ L 试剂三, 混匀后, 取 10 $\mu$ L 混合液, 按照显色反应阶段测定管加样体系操作, 依据结果即可制作标准曲线。