

过氧化氢酶（Catalase, CAT）试剂盒说明书

（微板法 96 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°C保存	
试剂一	液体 100mL×1 瓶	4°C保存	
试剂二	液体×1 支	4°C保存	用前甩几下使试剂落入底部, 分别取 80μL 至两个新EP管中, 再分别加 1.56mL 蒸馏水混匀备用。
试剂三	液体 11mL×1 瓶	室温	使用前混匀几下。
试剂四	液体 30mL×1 瓶	4°C保存	
标准品	液体 1 mL×1 支	4°C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°C×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°C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 (10⁴): 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(若浑浊, 则需 8000rpm 室温或 4°C 离心 10min 后取上清液进行⑥步测定)。	

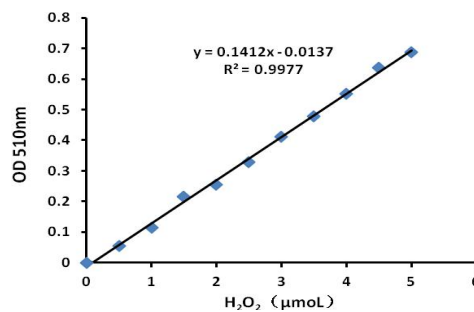
⑥ 显色反应:

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, $\Delta A = A_{\text{空白}} - A_{\text{测定}}$ 。	

- 【注】:** 1. 空白管的颜色 (粉红色) 最深, 若测定管的粉红色很浅或无粉红色即 A 测定值低于 0.25, 说明样本里过氧化氢酶活性高, 则可对样本用蒸馏水进行稀释后再加样测定, 稀释倍数记为 D; 或减少样本加样量 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)。则稀释倍数 D 和改变后的 T 和 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 ΔA 在零附近 (小于 0.01), 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 T 和 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 (μmol), y 为 ΔA 。



2、按样本鲜重计算:

单位定义: 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)。

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

3、按样本蛋白浓度计算:

单位定义: 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)。

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

4、按细胞数量计算:

单位定义: 在 25°C, 每 10⁴ 个细胞每分钟催化分解 1μmol H_2O_2 定义为一个酶活单位 (U)。

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

5、按照液体体积计算:

单位定义：在 25°C，每毫升液体每分钟催化分解 1 μ molH₂O₂ 定义为一个酶活单位（U）。

$$\text{CAT}(\mu\text{mol}/\text{min}/\text{mL})=[(\Delta\text{A}+0.0137)\div 0.1412]\div V_1\div T\times D=141.6\times(\Delta\text{A}+0.0137)\times D$$

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，万；

D---稀释倍数，未稀释即为 1；

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 标准品浓度：试剂盒所带的标准品母液浓度为 250mM。
- 2 把母液稀释成以下浓度：0, 50, 100, 150, 200, 250mM。也可根据实际来调整浓度。
- 3 20 μ L 标准品+80 μ L 试剂一+100 μ L 试剂三，混匀后，取 10 μ 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。

参考文献：

1. Gutteridge, J. M. C. & Halliwell, B. (1990). The measurement and mechanism of lipid peroxidation in biological systems. Trends in Biochemical Sciences, 15, 129-135.
2. Bergmeyer, H. U. (1983). Isolation and identification of algicidal compound from Streptomyces and algicidal mechanism to Microcystis aeruginosa. Methods of Enzymatic Analysis, Vol. 3, 273-286.