

过氧化氢酶 (Catalase, CAT) 试剂盒说明书

(货号: G0106W 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 21mL×1 瓶	室温	使用前混匀几下。
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(10^4):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)。	

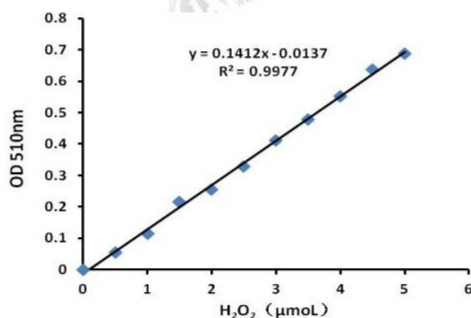
⑥ 显色反应:

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 标准品浓度 (μmol/L), y 为 ΔA 。



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)。

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

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)。

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

4、按细胞数量计算:

酶活定义: 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)。

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

5、按照液体体积计算:

酶活定义：在 25°C，每毫升液体每分钟催化分解 1 μ mol H₂O₂ 定义为一个酶活单位（U）。

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

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 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.

