

过氧化氢酶 (Catalase, CAT) 试剂盒说明书

(货号: G0105W48 微板法 48 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 60mL×1 瓶	4°C保存	
试剂一	液体 50mL×1 瓶	4°C保存	
试剂二	液体×1 支	4°C保存	使用前甩几下使试剂落入底部,分别取40μL至两个新EP管中,再分别加0.78mL蒸馏水混匀备用。
试剂三	液体 6mL×1 瓶	室温	使用前混匀几下。
试剂四	液体 15mL×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(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。

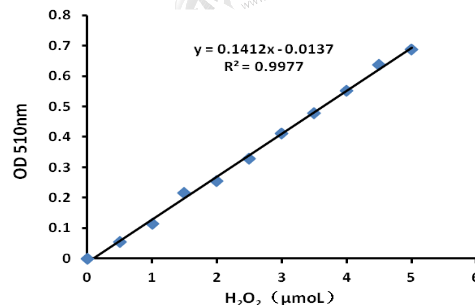
⑤ 在EP管中依次加入:

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

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)。

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

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)。

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

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)。

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

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 1μmol H_2O_2 定义为一个酶活单位 (U)。

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

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：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.