

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 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（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：

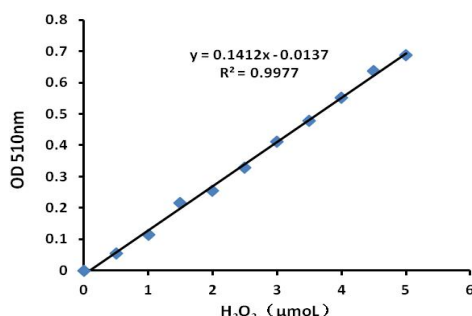
试剂名称 (μL)	测定管
样本	10
试剂一	70
试剂二	20
混匀, (观察有气泡产生, 酶活性越大, 则气泡越多), 室温 25°C准确反应 5min。	
试剂三	100
混匀后, 立即取 10μL 混合液(若浑浊, 则需 8000rpm 室温或 4°C离心 10min 后取上清液进行⑥步测定)。	

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

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 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)。

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

3、按样本蛋白浓度计算:

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)。

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

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)。

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

5、按照液体体积计算:

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)。

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

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 以上面不同浓度点为横坐标（x），对应的 ΔA 标准为纵坐标（y）绘制标准曲线，得到线性回归方程 $y=kx+b$ ，将 ΔA 测定带入公式中计算 x（mM）。

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.