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℃保存	
试剂一	液体 50mL×1 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 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℃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℃**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℃离心 10min 后取上清液进行⑥步测定)。	

⑥ 显色反应：

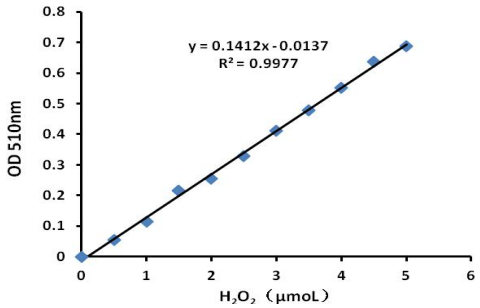
试剂名称（μL）	测定管
混合液	10
试剂一	900
试剂四	290
混匀，室温 25℃反应 5min，取 200μL 转移到 96 孔板中，510nm 处测定吸光值 A，ΔA＝A 空白-A 测定。	

【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℃，每克组织每分钟催化分解 1μmoLH_2O_2 定义为一个酶活单位（U）。

CAT(μmoL/min/g 鲜重)=[(ΔA+0.0137)÷0.1412]÷(W×V1÷V)÷T×D=141.6×(ΔA+0.0137)÷W×D

3、按样本蛋白浓度计算：

单位定义：在 25℃，每毫克组织蛋白每分钟催化分解 1μmoLH_2O_2 定义为一个酶活单位（U）。

CAT(μmoL/min/mg prot)=[(ΔA+0.0137)÷0.1412]÷(V1×Cpr) ÷T×D=141.6×(ΔA+0.0137)÷Cpr×D

4、按细胞数量计算：

单位定义：在 25℃，每 10^4 个细胞每分钟催化分解 1μmoLH_2O_2 定义为一个酶活单位（U）。

CAT(μmoL/min/10^4 cell)=[(ΔA+0.0137)÷0.1412]÷(500×V1÷V)÷T×D=0.283×(△A+0.0137)×D

5、按照液体体积计算：

单位定义：在 25℃，每毫升液体每分钟催化分解 1μmolH_2O_2 定义为一个酶活单位（U）。

CAT(μmoL/min/mL)=[(ΔA+0.0137)÷0.1412]÷V1÷T×D=141.6×(ΔA+0.0137)×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 20μL 标准品+80μL 试剂一+100μL 试剂三，混匀后，取 10μL 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.