过氧化氢酶（CAT）试剂盒说明书

（货号：ADS-W-KY002-48 微板法 48 样 有效期：9 个月）

一、指标介绍:

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：

试剂组分	试剂规格	存放温度	注意事项
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 瓶	4℃避光保存	每支： 1. 开盖前注意使试剂落入底部（可手动用一甩）； 2. 取 200μL 至新 EP 管中，加入 0.62mL 蒸馏水混匀备用； 3. 保存周期与试剂盒有效期相同。
试剂三	液体 6mL×1 瓶	室温	1. 使用前混匀几下； 2. 保存周期与试剂盒有效期相同。
试剂四	液体 15mL×1 瓶	4℃避光保存	
标准品	液体 1 mL×1 支	4℃避光保存	1. 若重新做标曲，则用到该试剂； 2. 按照说明书中标曲制作步骤进行配制； 3. 溶解后的标品一周内用完。

三、实验器材：

研钵（匀浆机）、冰盒（制冰机）、台式离心机、可调式移液枪、水浴锅（烘箱、培养箱、金属浴）、96 孔板、离心管、酶标仪、蒸馏水（去离子水、超纯水均可）。

四、指标测定：

建议先选取 1-3 个差异大的样本（例如不同类型或分组）进行预实验，熟悉操作流程，根据预实验结果确定或调整样本浓度，以防造成样本或试剂不必要的浪费！

1、样本提取：

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 液体样本：直接检测；若浑浊，离心后取上清检测。

③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。

2、**检测步骤：**

① 酶标仪预热 30min 以上（等仪器过自检程序亦可），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：

试剂组分（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：

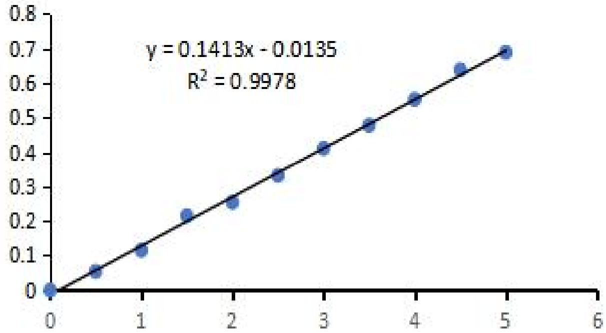
试剂组分（μL）	测定管
混合液	10
试剂一	900
试剂四	290
混匀，室温 25℃反应 5min，取 200μL 转移到 96 孔板中，510nm 处测定吸光值 A，ΔA = A 空白-A 测定。	

【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：$y = 0.1413x - 0.0135$：x 为 H_2O_2 标准品(μmoL)，y 为ΔA。



2、按样本鲜重计算：

酶活定义：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+0.0135)÷0.1413]÷(W×V1÷V)÷T×D=141.54×(ΔA+0.0135)÷W×D

3、按样本蛋白浓度计算：

酶活定义：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+0.0135)÷0.1413]÷(V1×Cpr)÷T×D=141.54×(ΔA+0.0135)÷Cpr×D

4、按照液体体积计算：

酶活定义：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+0.0135)÷0.1413]÷V1÷T×D=141.54×(ΔA+0.0135)×D

5、按细胞数量计算：

酶活定义：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+0.0135)÷0.1413]÷(500×V1÷V)÷T×D=0.283×(△A+0.0135)×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 标曲为非必做实验，用户可根据实验需求制作标曲，亦可直接采用说明书计算公式进行结果计算；
2 标准品浓度：试剂盒所带的标准品母液浓度为 250mM；
3 将母液用蒸馏水稀释成六个浓度梯度的标准品，例如：0, 50, 100, 150, 200, 250mM。也可根据实际样本调整标准品浓度；
4 标品稀释参照表如下：

标品浓度 mM	0	50	100	150	200	250
标品母液 uL	0	40	80	120	160	200
水 uL	200	160	120	80	40	0
各标准管混匀待用。						

5 依据测定管的加样表操作，根据结果，以 0 浓度吸光值减去各浓度吸光值，过 0 点制作标准曲线。在 EP 管中依次加入：

试剂组分（μL）	标准管	0 浓度管（仅做一次）
标准品	20	
蒸馏水		20
试剂一	80	80
试剂三	100	100
混匀后，**立即**取 10μL 混合液，按显色反应阶段测定管加样体系操作		

显色反应：

试剂组分（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 = A0 浓度-A 标准。	