

# 过氧化氢酶 (CAT) 测定试剂盒说明书

(货号: A007-1-1 钼酸铵法 100 管/96 样)

**免责声明:** 测试前请仔细阅读说明书, 预试后再进行批量实验, 否则由此导致的后果用户自行承担!

## 一、测定原理:

过氧化氢酶 (Catalase) 分解  $H_2O_2$  的反应可通过加入钼酸铵迅速中止, 剩余的  $H_2O_2$  与钼酸铵作用产生一种淡黄色的络合物, 在 405nm 处测定其变化量, 可算出 CAT 活力。

## 二、试剂盒组成与试剂配制: (试剂盒有效期 6 个月)

- 试剂一:** 液体 100mL×1 瓶, 4℃ 保存。
- 试剂二:** 底物液 10mL×1 瓶, 4℃ 保存。
- 试剂三:** 显色粉剂×1 瓶, 4℃ 保存。用前半小时加蒸馏水 100mL 溶解 (可适当 37℃ 加热加速溶解), 4℃ 可保存 1 个月。(存放后如果底部有不溶粉末沉淀, 直接取上清使用, 不影响测定)
- 试剂四:** 液体 10mL×1 瓶, 4℃ 保存。温度低时会凝固, 临用前 37℃ 加热至透明方可使用。

## 三、所需仪器及试剂:

可见光分光光度计及 0.5cm 光径比色皿 (或酶标仪 (405nm) 及 96 孔板), 涡旋混匀器, 37℃ 水浴锅, 蒸馏水, 生理盐水, 试管或离心管, 秒表, 蛋白测定试剂 (组织、细胞用, 本公司有售); 血红蛋白测定试剂 (红细胞、全血样本用, 本公司有售)。

## 四、操作步骤:

### (一)、样本前处理:

- 血清(浆)等液体样本:** 直接使用。
- 细胞培养液:** 吸取部分 4000 转/分离心 5 分钟, 取上清待测。
- 动物组织样本:** 准确称取组织重量, 按重量(g): 体积(mL)=1:9 的比例, 加入 9 倍体积的生理盐水, 冰水浴条件下机械匀浆, 4000 转/分, 离心 10 分钟, 取上清液待测 (上清液需要测定其蛋白浓度, 蛋白测定试剂盒本公司有售)。
- 植物组织样本:** 方法一是先将植物组织用 PBS 擦洗干净, 再用吸水纸吸干, 后剪碎放入研钵中, 液氮研磨成粉, 称取植物粉末, 按重量(g): 体积(mL)=1:9 的比例, 加入 9 倍体积的 PBS (0.01M, pH7.0~7.4), 涡旋震荡 (或研磨仪研磨) 1 分钟, 4000 转/分, 离心 10 分钟, 取上清液待测; 方法二是在洗净并擦干水分后, 直接称重, 按重量(g): 体积(mL)=1:9 的比例, 加入 9 倍体积的 PBS, 冰水浴条件下机械匀浆, 4000 转/分, 离心 10 分钟, 取上清液待测。(注: 一般水分含量较高的植物用方法二来, 相反水分含量低或者干样推荐用方法一处理)
- 细胞样本:** 收集细胞后, 每份细胞 (细胞数量尽量不要低于  $10^6$  个, 越多越好) 加入 0.3mL 的生理盐水, 冰水浴条件下超声破碎 (功率 200-300W, 运行 5 秒, 间隔 15 秒, 反复 3-5 次), 4000 转/分离心 10 分钟, 取上清液待测 (上清液需要测定其蛋白浓度, 蛋白测定试剂盒本公司有售)。

**全血样本:** 取全血按 1:99 的体积比加蒸馏水充分混匀放置 10 分钟后待测。(全血与水混合的比例可调整)。

**注:** 上述处理好的样本, 需先挑选 2 例按操作表进行预试, 摸索其最佳浓度 (最佳浓度一般选择  $\Delta A$  在 0.2 左右对应的一管稀释倍数; 但是有些样本 CAT 活力较低,  $\Delta A$  无法达到 0.2, 此时就需要用样本原液, 且延长 37℃ 准确反应时间来改善其结果, 尽量使  $\Delta A \geq 0.02$ ) 后方可批量实验。

### (二)、操作表:

(试剂一、试剂二提前 5 分钟 37℃ 预温)

	测定管	对照管
样本 (mL)	0.1	
试剂一 (mL)	1.0	1.0
试剂二 (mL)	0.1	0.1
加入试剂二的同时立即计时并混匀, 37℃ 准确反应 1 分钟 (60 秒) 后立即加入试剂三		
试剂三 (mL)	1.0	1.0
试剂四 (mL)	0.1	0.1
样本 (mL)		0.1
混匀, 波长 405nm, 光径 0.5cm, 蒸馏水调零, 分光光度计测定各管吸光度值 (或每管取 200 $\mu$ L 反应液加到 96 孔板中, 酶标仪 405nm 处读数, 计算时参考“注意事项第 1 条”), 计算 $\Delta A = A_{\text{对照}} - A_{\text{测定}}$		

- 注 1:** 一般情况下样本假如没有颜色、浊度等显著差异情况, 对照管的样本随机取 1~2 个做 (测得 OD 值可用于各个样本) 即可, 否则需每个样都做自身对照管 (如每个样本都做自身对照管, 则试剂盒所测定样本数量减至 48 样)。
- 注 2:** 为方便操作, 您可将测试前的准备工作做好: 编好试管, 测定管加入样本 0.1mL 及试剂一 1mL, 然后将试管放入 37℃ 水浴箱中预温 3-5 分钟。测试时, 往管中加入试剂二 0.1mL, 并立即混匀, 同时准确计时, 随后立即放入水浴锅中, 当反应到 60 秒时立即加入试剂三 (终止反应), 混匀。以此类推, 最后所有管一起加试剂四, 混匀, 比色。
- 注 3:** 对照管可以不用计时准确反应, 直接按操作表顺序从上往下加试剂即可。
- 注 4:** 全血样本测定时, 必须每个样本都做对照管 (此时试剂盒最多只能测 48 样)。

## 五、活力定义与计算:

(1)、血清 (浆) 等液体样本活力定义: 每毫升血清 (浆) 或液体样本对应的 CAT 每秒钟分解 1 $\mu$ mol 的  $H_2O_2$  为一个活力单位 (U)。

**计算公式为:**

$$\text{血清 (浆) 等液体样本 CAT 活力 (U/mL)} = \Delta A \times 271 \div V_{\text{样}} \div T \times N$$

(2)、组织或细胞样本按蛋白浓度计算活力定义: 样本中每毫克蛋白对应的 CAT 每秒钟分解 1 $\mu$ mol 的  $H_2O_2$  为一个活力单位 (U)。

**计算公式为:**

$$\text{组织、细胞中 CAT 活力 (U/mg 蛋白)} = \Delta A \times 271 \div V_{\text{样}} \div T \times N \div C_{\text{pr}}$$

(3)、组织样本按鲜重计算活力定义: 每克组织对应的 CAT 每秒钟分解 1 $\mu$ mol 的  $H_2O_2$  为一个活力单位 (U)。(大部分植物都适用这种定义及计算方式)

**计算公式为:**

$$\text{组织中 CAT 活力 (U/g 组织)} = \Delta A \times 271 \div V_{\text{样}} \div T \times N \div \frac{W}{V_{\text{样总}}}$$

(4)、细胞样本按细胞数计算活力定义: 每 1 万个细胞对应的 CAT 每秒钟分解 1 $\mu$ mol 的  $H_2O_2$  为一个活力单位 (U)。

**计算公式为:**

$$\text{细胞中 CAT 活力 (U/万个细胞)} = \Delta A \times 271 \div V_{\text{样}} \div T \times N \div \frac{\text{细胞总数}}{V_{\text{样总}}}$$

(5)、全血样本活力定义: 每毫克血红蛋白对应的 CAT 每秒钟分解 1 $\mu$ mol 的  $H_2O_2$  为一个活力单位 (U)。(全血也可用血清 (浆))

**的活力定义及计算方式**

**计算公式为：**

$$\frac{\text{全血中CAT}}{\text{活力 (U/mgHb)}} = \Delta A \times 271 \div V_{\text{样}} \div T \div C_{\text{Hb}}$$

以上计算公式中

271 为计算系数；

$V_{\text{样}}$  为本体系下的取样量，0.1mL；

T 为反应时间，60 秒；

N 为样本测试前稀释倍数；

W 为组织样本质量，g；

$V_{\text{样总}}$  为样本匀浆时的总体积（约等于匀浆时加入的匀浆介质的总体积），mL；

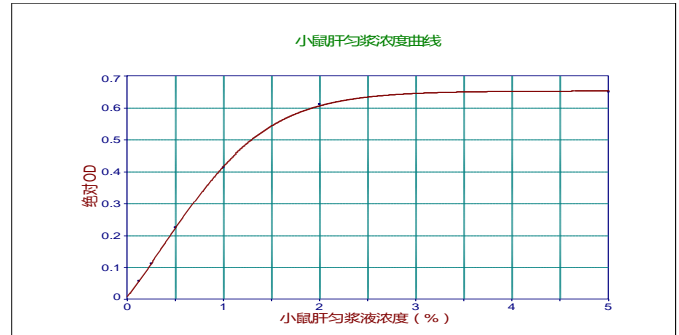
$C_{\text{pr}}$  为匀浆液蛋白浓度，mg/mL；

细胞总数为细胞前处理时的细胞总数，万个；

$C_{\text{Hb}}$  为溶血液血红蛋白浓度，mgHb/mL（血红蛋白测试盒本公司有售）。

测定 OD	0.613	0.560	0.451	0.272	0.086	0.067
绝对 OD	0.058	0.113	0.226	0.413	0.612	0.651

**五、小鼠组织最佳取样浓度的摸索曲线：**



**参考取样浓度：**小鼠肝脏匀浆为 0.125%~0.5%（绝对 OD 值在 0.1~0.4 之间，以 0.2 左右为最佳），在其范围内酶曲线通过回归曲线的处理，相对成正比关系。若取样浓度过大或过小，则在实验结束后，在进行统计学处理时会出现无显著差异。

**七、注意事项**

- 1、本试剂盒也可用酶标仪读数（即在反应完后取 200μL 反应液加入孔板（注意避免气泡产生），405nm 处读数，计算公式中的系数 271 变为 235.65 代入计算）。
- 2、植物样本在测定时，一般不需要稀释（因植物中 CAT 活力较低），可直接取样测定（或加大样本量测定），且植物组织在按比例加 PBS 匀浆时，可根据植物本身的含水量情况来调整，含水量高的植物，加入的 PBS 比例可适当降低，如按照 1:4 比例添加。
- 3、测定时，每个样本加入试剂二到加入试剂三应用液之间的间隔时间（60 秒或其它）必须固定；
- 4、细胞样本前处理也可参考本公司官网“技术支持”中“技术文章”介绍的。
- 5、有些样本测定时，对照 OD-测定 OD 值为零或为负值，那主要是由于样本中 CAT 活力较低加上操作误差导致的，此时可以将样本加入量加大（其它试剂量不变）以及延长反应时间（如本来是 60 秒，可以延长到 5 分钟或 10 分钟）使其更多的反应，以便于计算。

**附录:最佳取样浓度摸索（参考）**

一、样本来源：小鼠肝组织

二、前处理：

先制备小鼠肝 10%匀浆液，再用生理盐水稀释成不同的浓度：2.5%、1%、0.5%、0.25%、0.125%、0.0625% 按操作表测定。

三、操作表：

	测定管	对照管
不同浓度样本（mL）	0.1	
试剂一（mL）	1.0	1.0
试剂二（mL）	0.1	0.1
加入试剂二的同时立即计时并混匀,37℃准确反应 1 分钟（60 秒）后立即加入试剂三		
试剂三（mL）	1.0	1.0
试剂四（mL）	0.1	0.1
不同浓度样本（mL）		0.1
混匀，波长 405nm，光径 0.5cm，蒸馏水调零，分光光度计测定各管吸光度值，计算 $\Delta A = A_{\text{对照}} - A_{\text{测定}}$ 。		

**注：**肝组织样本 CAT 活力较高，一般都需要摸索最佳取样浓度（虾、蟹的除外）；其它样本如血清、植物、细胞等则 CAT 活力比较低，可直接取样操作。

四、检测结果：

对照 OD 值	0.671	0.673	0.677	0.685	0.698	0.718
匀浆液浓度	0.0625%	0.125%	0.25%	0.5%	1%	2.5%