

过氧化氢酶 (CAT) 测定试剂盒说明书(精简版)

(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 H₂O₂ 的反应可通过加入钼酸铵而迅速中止, 剩余的 H₂O₂ 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, 可计算出 CAT 的活力。

二、试剂组成与配制: (试剂盒有效期 6 个月)

试剂一: 液体 100mL×1 瓶, 4℃ 保存。

试剂二: 底物液体 10mL×1 瓶, 4℃ 保存。

试剂三: 显色粉剂×1 瓶, 4℃ 保存。用前半小时加双蒸水 100mL 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。天冷时会凝固, 临用前 37℃ 加热至透明方可使用。

三、所需仪器耗材及试剂:

含 405nm 波长的分光光度计及 0.5cm 光径比色皿 (或酶标仪及 96 孔板)、37℃ 水浴锅、台式低速离心机、各种规格移液器、双蒸水、生理盐水 (0.9%) 或 PBS (0.1M)、涡旋混匀器、离心管、蛋白测定试剂 (组织及细胞样本用, 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 (上清液需要测定其蛋白浓度, 蛋白测定试剂盒本公司有售) 待测。

植物组织样本: **方法一**是先将植物组织用 PBS 擦拭干净, 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, 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处理, 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 10⁶ 个, 越多越好) 加入 0.3mL 的生理盐水 (或者 PBS), 冰水浴下超声破碎 (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 (上清液需要测定其蛋白浓度, 蛋白测定试剂盒本公司有售) 待测。

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

(二)、操作表: (试剂一、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, 双蒸水调零, 分光光

度计测定各管吸光度值 (或每管取 200μL 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 1”), 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, 同时准确记时, 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。依次再测第二、第三管..., 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 1μmol 的 H₂O₂ 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)、**组织或细胞样本活力定义:** 样本中每毫克蛋白对应的 CAT 每秒钟分解 1μmol 的 H₂O₂ 为一个活力单位 (U)。

计算公式为:

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

(3)、**组织样本另一种活力定义:** 每克组织对应的 CAT 每秒钟分解 1μmol 的 H₂O₂ 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:

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

(4)、**细胞样本另一种活力定义:** 每 1 万个细胞对应的 CAT 每秒钟分解 1μmol 的 H₂O₂ 为一个活力单位 (U)。

计算公式为:

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

(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 1μmol 的 H₂O₂ 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:

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

注: 以上计算公式中

271 为斜率倒数, 常数, 直接使用;

V_样: 本体系下的取样量, 0.1mL;

T: 反应时间, 60 秒;

N: 样本测试前稀释倍数;

W: 组织样本质量, g;

V_{样总}: 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;

Cpr: 匀浆液蛋白浓度, mgprot/mL (prot 指蛋白);

细胞总数: 细胞前处理时的细胞总数, 万个;

C_{Hb}: 溶血液血红蛋白浓度, mg/mL (血红蛋白测试盒本所有售)。

六、注意事项

- 1、本试剂盒也可用酶标仪读数 (即在反应完后取 200 μ L 反应液加入孔板 (注意避免气泡产生), 405nm 处读数, 计算公式斜率倒数变为 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 1:4 加。
- 3、测定时, 加入试剂二的同时需要同时准确计时, 反应到 60 秒时必须立即加入试剂三以终止反应;
- 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 活力较低导致的, 此时可以将样本加入量加大 (其它试剂量不变) 或是延长反应时间 (如本来是 60 秒, 可以延长到 5 分钟或 10 分钟) 使其更充分的反应, 以便于计算。

附录:最佳取样浓度摸索参考

一、样本来源: 正常小鼠肝组织

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% 待测。

三、操作表:

	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 $^{\circ}$ C 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, 双蒸水调零, 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; 其它样本如血清、植物、细胞等则比较低。

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%
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%。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少, 则在实验结束后, 在进行统计学处理时会出现无显著差异。

