



## 过氧化氢酶(CAT)（钼酸铵法）检测试剂盒说明书

（货号：PB1193W96 微量法 96样）

有效期：3个月

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！

### 测定原理：

过氧化氢能氧化  $\text{MoO}^{2-}$  成  $\text{MoO}_4^{2-}$ ,  $\text{MoO}_4^{2-}$  接受氢氧根的电子成键，分子间立即脱水缩合，得到稳定的黄色复合物  $(\text{H}_2\text{MoO}_4 \cdot \text{XH}_2\text{O})_n$  在 405nm 处有强烈吸收峰，其吸光值和过氧化氢浓度成线性关系。测定出体系剩余过氧化氢在 405nm 的吸光值即可反映 CAT 的催化活性。需自备的

### 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

### 试剂组成和配制：

提取液：液体 100 mL×1 瓶，4℃保存；

试剂一：液体 10 mL×1 瓶，4℃避光保存；

试剂二：液体 30mL×1 瓶，常温保存；（过饱和试剂，如有结晶析出，可 37℃加热搅拌溶解）

试剂三：液体 90mL×1 瓶，4℃保存；（过饱和试剂，如有絮状沉淀，可 37℃加热搅拌溶解）

标准溶液：液体 1mL×1 支，4℃保存（500mM）。

### 粗酶液提取：

1、细菌、细胞或组织样品的制备：

细菌或培养细胞：先收集细菌或细胞到离心管内，离心后弃上清；按照细菌或细胞数量

（104 个）：提取液体积（mL）为 500~1000: 1 的比例（建议 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 20%或 200W，超声 3s，间隔 10s，重复 30 次）；8000g 4℃离心 10min，取上清，置冰上待测。

组织 按照组织质量（g）：提取液体积（mL）为 1: 5~10 的比例（建议称取约 0.1g 组织，加入 1mL 提取液），进行冰浴匀浆。8000g 4℃离心 10min，取上清，置冰上待测。

2、血清（浆）样品：直接检测。

### 测定步骤：

1、酶标仪预热 30min 以上，调节波长至 405 nm。

2、标准曲线的制备：取 500mM 的过氧化氢标准液用蒸馏水稀释成不同浓度：0  $\mu\text{mol/ml}$ 、12.5  $\mu\text{mol/ml}$ 、25  $\mu\text{mol/ml}$ 、50  $\mu\text{mol/ml}$ 、100  $\mu\text{mol/ml}$ 、150  $\mu\text{mol/ml}$ 、200  $\mu\text{mol/ml}$ 、250  $\mu\text{mol/ml}$ ，进行标准曲线的制备。

| 编号                              | ①   | ②   | ③   | ④   | ⑤   | ⑥   | ⑦    | ⑧   |
|---------------------------------|-----|-----|-----|-----|-----|-----|------|-----|
| 标准品浓度( $\mu\text{mol/ml}$ )     | 250 | 200 | 150 | 100 | 50  | 25  | 12.5 | 0   |
| 稀释前标准品浓度 ( $\mu\text{mol/ml}$ ) | 500 | 500 | 500 | 500 | 500 | 500 | 25   | 500 |

|            |    |    |    |    |    |    |    |    |
|------------|----|----|----|----|----|----|----|----|
| 标准液体积 (μl) | 50 | 40 | 30 | 20 | 10 | 5  | 50 | 0  |
| 蒸馏水体积 (μl) | 50 | 60 | 70 | 80 | 90 | 95 | 50 | 50 |

3、在 EP 管中加入下列试剂

| 试剂名称 (μL)                                                                                                                  | 测定管 | 对照管 | 标准管 |
|----------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|-----|-----|-----|
| 样本                                                                                                                         | 10  |     |     |
| 标准品                                                                                                                        |     |     | 10  |
| 试剂一                                                                                                                        | 30  | 30  |     |
| 蒸馏水                                                                                                                        |     |     | 30  |
| 充分混匀, 25℃准确反应 10min                                                                                                        |     |     |     |
| 试剂二                                                                                                                        | 100 | 100 | 100 |
| 试剂三                                                                                                                        | 360 | 360 | 360 |
| 样本                                                                                                                         |     | 10  |     |
| 混匀, 取 200μL 于 96 孔板立即测定 A 测定、A 对照、A 标准, $\Delta A$ 测定 = A 对照 - A 测定, $\Delta A$ 标准 = A 标准 - A 标准 (0 μmol/ml)。每个测定管需设一个对照管。 |     |     |     |

### 结果计算:

标准曲线的绘制以标准品浓度为 x 轴, 以其对应的  $\Delta A$  标准为 y 轴, 绘制标准曲线, 得到标准方程  $y=kx+b$ , 将  $\Delta A$  测定带入公式中得到 x (μmol/ml)。

(1) 按照样本蛋白浓度计算

酶活定义: 每毫克组织蛋白每分钟催化分解 1μmolH<sub>2</sub>O<sub>2</sub> 定义为一个酶活单位 (U)。

$$\begin{aligned} \text{CAT(U/mg prot)} &= x \times V_{S1} \div (V_{\text{样}} \times \text{Cpr}) \div T \times D \\ &= 0.3 \times x \div \text{Cpr} \times D \end{aligned}$$

(2) 按照样本质量计算

酶活定义: 每克组织每分钟催化分解 1μmolH<sub>2</sub>O<sub>2</sub> 定义为一个酶活单位 (U)。

$$\begin{aligned} \text{CAT(U/g 鲜重)} &= x \times V_{S1} \div (W \times V_{\text{样}} \div V_{\text{样总}}) \div T \times D \\ &= 0.3 \times x \div W \times D \end{aligned}$$

(3) 按照细胞数量计算

酶活定义: 每 10<sup>4</sup> 个细胞每分钟催化分解 1μmolH<sub>2</sub>O<sub>2</sub> 定义为一个酶活单位 (U)。

$$\begin{aligned} \text{CAT(U/10}^4 \text{ cell)} &= [x \times V_{S1} \div (500 \times V_{\text{样}} \div V_{\text{样总}})] \div T \times D \\ &= 0.3 \times x \div 500 \times D \end{aligned}$$

(4) 按照液体体积计算

酶活定义: 每毫升液体每分钟催化分解 1μmolH<sub>2</sub>O<sub>2</sub> 定义为一个酶活单位 (U)。

$$\begin{aligned} \text{CAT(U/mL)} &= x \times V_{S1} \div V_{\text{样}} \div T \times D \\ &= 0.3 \times x \times D \end{aligned}$$

$V_{S1}$ : 反应体系中加入试剂一的体积, 0.03 mL;  $V_{\text{样}}$ : 加入样本体积, 0.01 mL;  $V_{\text{样总}}$ : 加入提取液体积, 1 mL; T: 反应时间, 10 min; W: 样本质量, g; Cpr: 样本蛋白质浓度, mg/mL; 500: 细胞或细菌个数。



**注意事项：**

- ①若测定吸光值超出标准线性吸光范围：高于最高值建议将粗酶液适当稀释后再进行测定；低于最低值建议适当增加样本量后再进行测定，计算时相应修改；
- ②由于反应时长是 10min，若一次性待检样本较多，可分批检测样本。