

过氧化氢酶(CAT) (显色) 检测试剂盒说明书

(货号: PB1185W96 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!

测定意义:

CAT(EC 1.11.1.6)广泛存在于动物、植物、微生物和培养细胞中, 是最主要的 H_2O_2 清除酶在活性氧清除系统中具有重要作用。

测定原理:

在过氧化氢相对比较充足的情况下, 过氧化氢酶可以催化过氧化氢产生水和氧气。残余的过氧化氢在过氧化物酶 (Peroxidase) 的催化下可以氧化生色底物, 产生红色的产物。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。

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 100ml×1 瓶, 4℃保存;

试剂一: 液体 60ml×2 瓶, 4℃保存;

试剂二: 液体 200 μ l×1 瓶, 4℃保存; 用前甩几下使试剂落入底部, 分别取出 40 μ l 至两个新 EP 管中, 再分别加 1.56ml 蒸馏水混匀备用。

试剂三: 液体 12ml×1 瓶, 4℃保存;

试剂四: 液体 35ml×1 瓶, 4℃避光保存;

标准溶液: 液体 1ml×1 支, 4℃保存 (500mM)。

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 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。

测定步骤:

1、酶标仪预热 30min 以上, 调节波长至 510nm。

2、过氧化氢标准曲线的制备: 取 500mM 的过氧化氢标准液用蒸馏水稀释成不同浓度: 0mM、50mM、100mM、150mM、200mM、250mM、300mM, 进行标准曲线的制备。



浓度	过氧化氢标准液 (μl)	蒸馏水 (μl)
0mM	0	50
50mM	5	45
100mM	10	40
150mM	15	35
200mM	20	30
250mM	25	25
300mM	30	20

10μL 标准品+90μL 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（也可根据实际样本来调整标准品浓度）。

5、在 EP 管中依次加入：

试剂名称 (μL)	测定管	空白管
样本	10	
试剂一	80	90
试剂二	10	10
混匀，（观察有气泡产生，酶活性越大，则气泡越多）， 37℃（哺乳动物）或 25℃（其它物种）准确反应 5min。		
试剂三	100	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	空白管	标准管
样本混合液	10		
空白混合液		10	
标准品混合液			10
试剂一	900	900	900
试剂四	290	290	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，记作 A 测定、A 空白、A 标准， $\Delta A_{测定} = A_{测定} - A_{空白}$ (0 μmol)； $\Delta A_{标准} = A_{标准} - A_{空白}$ (0 μmol)			

结果计算：

标准曲线的绘制以过氧化氢的量（0 μmol、0.5 μmol、1 μmol、1.5 μmol、2 μmol、2.5 μmol、3 μmol）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)。

计算出样品中残余的过氧化氢微摩尔数。

残余过氧化氢微摩尔数 = $(\Delta A_{测定} - b)/k$

[消耗过氧化氢微摩尔数] = [空白对照残余过氧化氢微摩尔数] - [样品残余过氧化氢微摩尔数]

(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 $1\mu\text{molH}_2\text{O}_2$ 定义为一个酶活单位 (U)。

$$\text{CAT(U/mg prot)} = [\text{消耗过氧化氢微摩尔数}] \div (\text{V 样} \times \text{Cpr}) \div \text{T} \times \text{D} \\ = 20 \times [\text{消耗过氧化氢微摩尔数}] \div \text{Cpr} \times \text{D}$$

(2) 按照样本质量计算

酶活定义：每克组织每分钟催化分解 $1\mu\text{molH}_2\text{O}_2$ 定义为一个酶活单位 (U)。

$$\text{CAT(U/g 鲜重)} = [\text{消耗过氧化氢微摩尔数}] \div (\text{W} \times \text{V 样} \div \text{V 样总}) \div \text{T} \times \text{D} \\ = 20 \times [\text{消耗过氧化氢微摩尔数}] \div \text{W} \times \text{D}$$

(3) 按照细胞数量计算

酶活定义：每 10^4 个细胞每分钟催化分解 $1\mu\text{molH}_2\text{O}_2$ 定义为一个酶活单位 (U)。

$$\text{CAT(U/10}^4\text{ cell)} = [\text{消耗过氧化氢微摩尔数}] \div (500 \times \text{V 样} \div \text{V 样总}) \div \text{T} \times \text{D} \\ = 0.04 \times [\text{消耗过氧化氢微摩尔数}] \times \text{D}$$

(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 $1\mu\text{molH}_2\text{O}_2$ 定义为一个酶活单位 (U)。

$$\text{CAT(U/mL)} = [\text{消耗过氧化氢微摩尔数}] \div \text{V 样} \div \text{T} \times \text{D} \\ = 20 \times [\text{消耗过氧化氢微摩尔数}] \times \text{D}$$

W: 样本质量, g; Cpr: 样本蛋白质浓度, mg/mL, 蛋白浓度需自行测定; V 样总: 加入的提取液体积, 1mL; 500: 细胞数量, 500 万; V 样: 加入样本体积, 0.01ml; T: 反应时间, 5min; D: 稀释倍数, 未稀释即为 1。

注意:

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, 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;
2. 若测定管颜色与空白管颜色接近, 说明样本里面过氧化氢酶活性低, 则可增加样本加样量 V 样 (如增至 $50\mu\text{L}$, 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 V 样需重新代入公式计算。
3. 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。