

过氧化氢酶（Catalase, CAT）活性检测试剂盒

（货号：RBC0019 微板法 120T/96S）

一、产品简介：

过氧化氢酶（CAT）广泛存在于动物、植物、微生物和培养细胞中，是生物演化过程中建立起来的生物防御系统关键酶，其主要功能是催化生物体内的 H_2O_2 分解，使机体免受自由基损伤，在活性氧清除系统中具有重要作用。

H_2O_2 在 240 nm 处具有特征吸收峰，过氧化氢酶能够分解 H_2O_2 ，使反应溶液在 240 nm 处吸光值随反应时间而下降，根据吸光值变化速率即可表征过氧化氢酶的活性。

二、试剂盒组分与配制：

试剂名称	规格	保存要求	备注
提取液	液体 110mL×1 瓶	4°C保存	
试剂一	液体 30mL×1 瓶	4°C保存	
试剂二	液体 2ml×1 支	4°C保存	
CAT 工作液	空瓶×1 支	4°C保存	
CAT 检测工作液的配制(现用现配):使用前吸取 1.5ml 试剂二加入 28.5 mL 试剂一（或按比例配制）充分混匀，即为 CAT 检测工作液，配制后 4°C可保存一周。			

三、所需的仪器和用品：

酶标仪、96 孔 UV 板、台式离心机、恒温水浴锅、可调式移液器、研钵/匀浆器、可调式移液器和蒸馏水。

四、过氧化氢酶（CAT）活性测定：

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！

1、样本制备：

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°C×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°C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。

2、上机检测：

① 酶标仪预热 30 min 以上，调节波长至 240 nm；

② 试验前将 CAT 检测工作液 37°C（哺乳动物）或 25°C（其他物种）预热 10 min；



③ 操作表:

试剂名称 (μL)	测定管
样本	10
工作液	190
充分混匀并立即开始计时, 立即测定 240 nm 处 5 s 时吸光值 A1 和 65 s 时吸光值 A2, 计算 $\Delta A=A1-A2$ 。	

五、结果计算:
1、按样本质量计算:

酶活定义: 每 g 组织每分钟催化 1 μmol H₂O₂ 降解定义为一个酶活力单位。

$$\text{CAT(U/g 质量)} = [\Delta A \times V_{\text{反总}} \div (\epsilon \times d) \times 10^6] \div (V_{\text{样}} \times W) \div T = 458.7 \times \Delta A \div W$$

2、按样本蛋白浓度计算:

酶活定义: 每 mg 组织蛋白在反应体系中每分钟催化 1 μmol H₂O₂ 降解定义为一个酶活力单位。

$$\text{CAT(U/mg prot)} = [\Delta A \times V_{\text{反总}} \div (\epsilon \times d) \times 10^6] \div (V_{\text{样}} \times \text{Cpr}) \div T = 458.7 \times \Delta A \div \text{Cpr}$$

3、按细胞数量计算:

酶活定义: 每 1 万个细菌或细胞在反应体系中每分钟催化 1 μmol H₂O₂ 降解定义为一个酶活力单位。

$$\begin{aligned} \text{CAT 酶活(U/10}^4 \text{ cell)} &= [\Delta A \times V_{\text{反总}} \div (\epsilon \times d) \times 10^6] \div (\text{细菌或细胞数量} \times V_{\text{样}} \div V_{\text{样总}}) \div T \\ &= 458.7 \times \Delta A \div \text{细菌或细胞数量} \end{aligned}$$

4、按照液体体积计算:

酶活定义: 每 ml 液体在反应体系中每分钟催化 1 μmol H₂O₂ 定义为一个酶活单位 (U)。

$$\text{CAT(U/mL)} = [\Delta A \times V_{\text{反总}} \div (\epsilon \times d) \times 10^6] \div V_{\text{样}} \div T = 458.7 \times \Delta A$$

V 反总: 反应体系总体积, 2×10⁻⁴ L;

ε: H₂O₂ 摩尔吸光系数, 43.6 L/mol/cm;

d: 比色皿光径, 1cm;

V 样: 加入样本体积, 0.01mL;

V 样总: 加入提取液体积, 1mL;

T: 反应时间, 1min;

W: 样本质量, g;

细菌或细胞数量: 以万计;

10⁶: 单位换算系数, 1mol=10⁶μmol。

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。

注意事项:

①若吸光值超过 3, 请检查使用的是否为石英比色皿或 UV 板;

②反应过程气泡过多表明酶活性过高, 结果可能为负值, 建议将粗酶液使用提取液适当稀释后再进行测定; 若稀释样本或反应体系没有产生气泡仍然出现较小的负值, 说明该样本测不到 CAT 活性;

③使用 96 孔 UV 板测定时建议使用多道移液器, 且分次进行检测, 以确保组间反应时间一致。

