

(本试剂盒仅供体外研究使用，不用于临床诊断!)

过氧化氢酶活性测定试剂盒 Catalase (CAT) Activity Assay Kit

产品货号: BC00005

产品规格: 100T

使用前请仔细阅读说明书。如果有任何问题，请通过以下方式联系我们:

✉ 邮箱 (销售) order@enkilife.cn

✉ 邮箱 (技术支持) tech@enkilife.cn

☎ 公司电话 027-87002838

🌐 网址 www.enkilife.cn



订阅微信公众号
获取更多技术
信息及前沿动态

保质期: 请见试剂盒外包装标签。

技术支持: 为了更好地给您提供服务, 联系时请告知产品外包装标签上批号。

基本信息

产品中文名称	过氧化氢酶活性测定试剂盒
产品英文名称	Catalase (CAT) Activity Assay Kit
检测方法	Colorimetric
样品类型	组织、细胞
检测类型	Enzyme activity
检测仪器及波长	酶标仪 (240 nm、520 nm)
检测范围	0.1-1U/mL
灵敏度	0.1U/mL

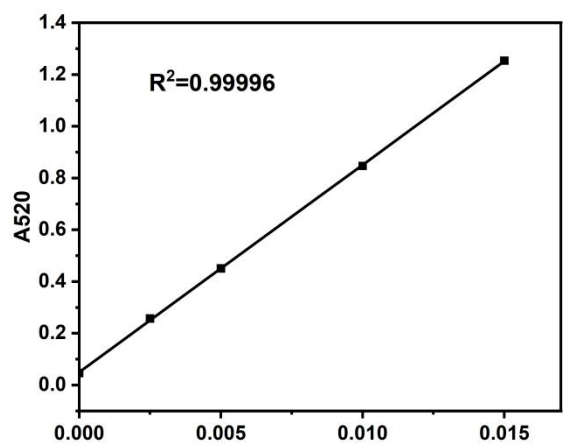
产品简介

通过显色反应来检测细胞、组织或其它样品中过氧化氢酶(Catalase)活性。过氧化氢酶是一种常见的酶，在生物体内发挥着重要的氧化还原作用，广泛分布于肝脏、肾脏和红细胞中。

检测原理

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。未反应的剩余过氧化氢在过氧化物酶的催化下可以氧化显色底物，得到红色的产物，其最大吸收波长为 520nm。通过测定 A520，与过氧化氢标准品制作的标准曲线对照，可以计算出样品中的过氧化氢酶消耗了多少量的过氧化氢，从而可以计算出样品中过氧化氢酶的酶活力。

下图展示了本试剂盒检测过氧化氢标准品的 A520 读数。



产品组分

产品名称	包装规格 (100T)	保存方式
过氧化氢酶检测缓冲液	60ml	-20℃, 开瓶后 2-8℃保存。
过氧化氢 (约 1M)	5ml	-20℃
过氧化氢酶反应终止液	50ml	-20℃, 开瓶后 2-8℃保存。
显色底物	20ml	-20℃
过氧化物酶	20μl	-20℃
96 孔酶标板	1 板	RT
96 孔覆膜	2 张	RT

保存条件

未拆封的试剂盒可在 -20℃保存 12 个月。

实验前准备

• 样品处理

用适当的裂解液裂解细胞或组织。用本试剂盒提供的过氧化氢酶检测缓冲液稀释样品，裂解好的样品至少加入等体积的过氧化氢酶检测缓冲液进行稀释。具体的稀释倍数可以参考下表。

样品名称	蛋白浓度 (mg/ml)	检测时的样品使 用量(μl)	反应时间 (min)	A520(空白对照- 样品)
空白(实测值)				1.20-1.32
Human red blood cell lysate	0.2	2-6	2	0.21-0.71
Rat liver lysate	0.3	5-10	1	0.36-0.78
Rat spleen lysate	0.3	5-10	3	0.11-0.21
Rat kidney lysate	0.3	5-10	3	0.28-0.57
Rat brain lysate	0.7	10-20	3	0.014-0.028

Jurkat lysate	2.0	2-4	3	0.28-0.64
HepG2 lysate	2.0	2-4	3	0.21-0.43

表中的数据仅供参考，实际测定值由于检测体系的不同等可能与参考值之间存在 20-50% 的误差。对于表中没有列出的样品，可以参考表中的类似样品进行检测，然后再根据检测结果适当调整蛋白浓度和样品使用量或反应时间。通常对于完全未知的样品，可以对样品进行 1、10、20 和 50 倍稀释，然后各取 10 μ l，反应 1 分钟。样品稀释后的浓度，最好可以使反应体系中的过氧化氢在反应 1-5 分钟后减少 30-50% 左右，这时的检测结果更加精确。

• 试剂盒的准备工作

1. 配制 250mM 过氧化氢溶液

本试剂盒提供的过氧化氢浓度约为 1M。由于过氧化氢稳定性较差，使用前需自行测定过氧化氢的实际浓度。把浓度约为 1M 的过氧化氢用本试剂盒提供的过氧化氢酶检测缓冲液稀释 100 倍，使过氧化氢的浓度约为 10mM。测定 A240。A240 的测定可采用如下任一方法：

- a. 普通紫外分光光度计法：使用含比色皿架的紫外分光光度计、NanoDrop 2000C、NanoDrop One^c、QuickDrop 等仪器，配套石英比色皿。确定比色皿光程(path length)，一般为 1cm。用比色皿检测的过氧化氢浓度最接近实际浓度。
- b. 微量紫外分光光度计法：如 NanoDrop 2000、NanoDrop One、QuickDrop、含超微量检测板 μ Drop Plate 的 Varioskan 等仪器。确定光程：对于 NanoDrop 2000、NanoDrop One 等，需要取消“自动化光程”，此时光程一般为 0.1cm；Varioskan 的超微量检测板 μ Drop Plate 的光程一般为 0.05cm。具体的微量紫外分光光度计的光程请参考仪器参数。
- c. 96 孔紫外酶标仪法(须能检测 240nm 波长)：根据 96 孔板的参数确定光程，一般 200 微升样品的光程为 0.552cm (样品体积除以 96 孔单孔孔内横截面面积)。一般建议使用专用的 96 孔紫外检测板(如 96 孔 UV 板)，如果没有紫外检测板，也可使用一般的 96 孔板，但由于为非紫外检测专用板，会有非常高的紫外吸收信号，所以需要设置含等量双蒸水的孔作为空白对照(一般 200 μ l 水在该类 96 孔板的 A240 在 3.8 左右)，计算时须减去该空白对照。在使用非紫外检测专用板的情况下，由于 96 孔酶标仪在 240nm 的检

测上限有限，建议将过氧化氢稀释至约 10mM 左右后再进行浓度测定。

注意：以上方法都需要设置等量双蒸水作为空白对照，并在计算时减去该空白对照。

过氧化氢浓度计算公式： $c=A/(\epsilon \times b)$ 。其中：c 为样品浓度(单位为 mol/L 或 M)；A 为吸光值； ϵ 为波长依赖的摩尔消光系数(单位为 $L \times mol^{-1} \times cm^{-1}$ 或 $M^{-1} \times cm^{-1}$)，过氧化氢的摩尔消光系数为 $43.6 M^{-1} cm^{-1}$ ；b=光程(单位为 cm)。

因此：过氧化氢浓度(M)= $A_{240}/(43.6 \times b)$ ；即：过氧化氢浓度(mM)= $22.94 \times A_{240}/b$ 从而计算出本试剂盒提供的过氧化氢的实际浓度。然后再根据实际的过氧化氢浓度用过氧化氢酶检测缓冲液稀释配制 250mM 过氧化氢溶液。

2. 配制 5mM 过氧化氢溶液

根据测定得到的实际过氧化氢浓度用过氧化氢酶检测缓冲液稀释配制 5mM 过氧化氢溶液。

3. 配制显色工作液

在冰浴上溶解显色底物，适当分装后再使用，尽量避免反复冻融。其它试剂放置在冰浴上备用。取适当量的过氧化物酶，按照 1:1000 的比例用显色底物稀释，配制成显色工作液。例如取 5 μ l 过氧化物酶，加入 5ml 显色底物，混匀即得到 5ml 显色工作液。

操作流程

1. 标准曲线的测定

取 0、12.5、25、50 或 75 微升配制好的 5mM 过氧化氢溶液至 1.5ml 或 0.5ml 塑料离心管中，分别加入过氧化氢酶检测缓冲液至最后体积为 100 微升，混匀，此时过氧化氢溶液浓度分别为 0、0.625、1.25、2.5、3.75mM。如有需要，可以设置更高浓度的过氧化氢标准溶液。

各取 4 微升，分别加入到 96 孔板中的各孔内。加入 200 μ l 显色工作液。25 $^{\circ}$ C 至少孵育 15 分钟后测定 A520，但孵育时间不宜超过 45 分钟。本步骤可以和样品测定步骤中的最后一步同时进行。操作表如下：

	标准孔	测定孔
不同浓度过氧化氢标准品(μ L)	4	--

待测样本(μL)	--	4
显色工作液(μL)	200	200
25°C 至少孵育 15 分钟后测定 A520，但孵育时间不宜超过 45 分钟。		

2. 样品的测定

试剂	空白对照(μL)	样品(μL)
样品体积	0	x
过氧化氢酶检测缓冲液	40	40-x
250mM 过氧化氢溶液	10	10

- (1) 参考上表，取 x 微升(0-40 微升)样品至 1.5ml 塑料离心管中，加入过氧化氢酶检测缓冲液至体积为 40 微升(即加入 40-x 微升过氧化氢酶检测缓冲液)，混匀。再加入 10 微升 250mM 过氧化氢溶液，用移液器迅速混匀。样品准备中的表格，25°C 反应 1-5 分钟。
- (2) 加入 450 微升过氧化氢酶反应终止液，颠倒混匀或振荡混匀以终止反应。需在终止反应后 15 分钟内完成下面的步骤(3)和步骤(4)。
- (3) 在一洁净的塑料离心管内加入 40 微升过氧化氢酶检测缓冲液，再加入 10 微升已终止并混匀的上述反应体系，混匀。
- (4) 从上一步骤的 50 微升体系中取 10 微升加入到 96 孔板中的一个孔内。加入 200 微升显色工作液。
- (5) 25°C 至少孵育 15 分钟后测定 A520，但孵育时间不宜超过 45 分钟。

结果计算

1. 利用标准品绘制标准曲线，计算出过氧化氢微摩尔数(x)和 A520(y)的关系，得到计算公式， $y=kx+b$ 。其中 k 为线性拟合曲线的斜率，b 为截距。
2. 利用上述公式，根据样品测得的 A520 值，计算出样品中参与过氧化氢微摩尔数。
3. 过氧化氢酶酶活力单位的定义：1 个酶活力单位(1 unit)在 25°C，pH7.0 的条件下，在 1 分钟内可以催化分解 1 微摩尔过氧化氢。
4. 对于细胞或组织样品的过氧化氢酶活力计算：

$$[\text{样品过氧化氢酶酶活力}] = [\text{消耗过氧化氢微摩尔数}] \times [\text{稀释倍数}] / ([\text{反应分钟数}] \times$$

[样品体积] × [蛋白浓度])

[样品过氧化氢酶活力]的单位为 units/mg 蛋白

[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]

[稀释倍数] = 250

[反应分钟数]即为实际的反应分钟数

[样品体积]为表 2 中的 X 微升，以毫升来表示即为 X/1000 毫升。

[蛋白浓度]为取 X 微升样品时，样品中的蛋白浓度，单位为 mg/ml。

5. 对于血浆等液体样品的过氧化氢酶活力计算：

[样品过氧化氢酶活力] = [消耗过氧化氢微摩尔数] X [稀释倍数] / ([反应分钟数] X [样品体积])

[样品过氧化氢酶活力]的单位为 units/ml 样品

注意事项

1. 待测的过氧化氢酶样品，无论是纯的过氧化氢酶还是细胞或组织裂解产物，在 4℃ 通常可以保存 1 周，-70℃ 可以长期保存，但-20℃ 保存后过氧化氢酶的活力会显著下降。
2. 在检测过程中加入过氧化氢酶反应终止液后 15 分钟内需开始显色反应。
3. 过氧化氢稳定性差，精确的过氧化氢浓度需参考本说明书中的方法进行测定。
4. 如需对样品中的过氧化氢酶活力进行精确定量，需自备蛋白浓度测定试剂盒，如 BCA 蛋白浓度测定试剂盒测定样品的蛋白浓度。
5. 本产品仅限于专业人员的科学研究用，不得用于临床诊断或治疗，不得用于食品或药品，不得存放于普通住宅内。