上海源叶生物科技有限公司
Shanghai yuanye Bio-Technology Co.， Ltd
电话：400-666-5481　传真：021-55068248
网址：www.shyuanye.com
邮箱：3008007435@qq.com

过氧化氢酶(CAT)试剂盒-可见显色法

货号：R45141-48S/96S/196S

产品简介：

过氧化氢酶(CAT，EC1.11.1.6)普遍存在于植物动物组织中，其活性与生物体的代谢强度及抗寒、抗病能力有一定关系。本试剂盒提供一种简单，灵敏，快速的测定方法，即CAT 催化过氧化氢产生水与氧气，剩余的过氧化氢与一种新型显色探针显色，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。

本试剂盒突出特点是从紫外波长(240nm：过氧化氢的检测波长)转换到可见波长(510nm)检测，无需使用石英比色皿或UV板。而且由于过氧化氢极其不稳定，直接检测造成读值不稳定，且蛋白质等组分在此紫外波长下也有光吸收，影响结果精确性。

物试剂盒组分与配制：

试剂名称	R45141-48S	R45141-96S	R45141-196S	保存要求	备注
提取液	液体60mL×1瓶	液体110mL×1瓶	液体110mL×1瓶	4℃保存	用前摇匀，且用蒸馏水稀释一倍后再使用。
试剂一	液体50mL×1瓶	液体100mL×1瓶	液体100mL×1瓶	4℃保存	
试剂二	液体×1支	液体×1支	液体×1支	4℃保存	用前甩几下使试剂落入底部，取80uL至两个新EP管中，再加1.56mL蒸馏水混匀备用。
试剂三	液体6mL×1瓶	液体11mL×1瓶	液体21mL×1瓶	室温	使用前混匀几下。
试剂四	液体15mL×1瓶	液体30mL×1瓶	液体60mL×1瓶	4℃保存	
标准品	液体1mL×1支	液体1mL×1支	液体1mL×1支	4℃保存	若重新做标曲，则用到该试剂

所需的仪器和用品：

酶标仪、台式离心机、可调式移液器、96孔板、研钵、冰和蒸馏水。

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℃×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：如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);12000rpm4℃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30min以上，调节波长至510nm。

② 试剂二事先按照试剂配制要求配制好，再进行以下操作。

③ 先检测空白管(仅做一次)：80uL试剂一+20uL试剂二+100uL试剂三，立即混匀后后取10uL，立即按照第⑥步显色反应依次加样检测。吸光值即为A空白。

④ 建议：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。

⑤ 在EP 管中依次加入：

试剂名称(μL)	测定管
样本	10
试剂一	70
试剂二	20
混匀，(观察有气泡产生，酶活性越大，则气泡越多)，室温25℃准确反应5min。	
试剂三	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)。

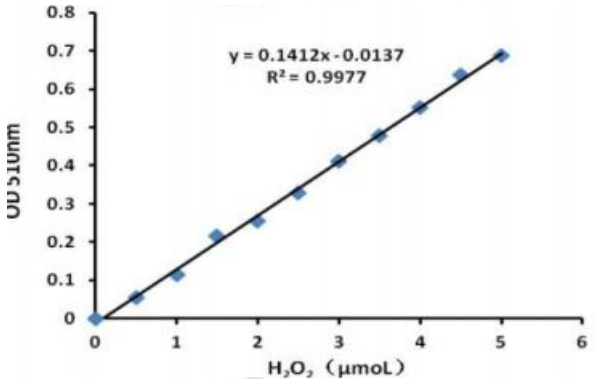
⑥　显色反应：

试剂名称(μL)	测定管
混合液	10
试剂一	900
试剂四	290
混匀，室温25℃反应5min,取200uL转移到96孔板中，510nm处测定吸光值A，ΔA=A空白-A测定。	

[注]：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即A测定值低于0.25，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：或减少样本加样量V1(如减至5L，则试剂一相应增加，保持总体积不变)，或减少反应时间T(如由5min减至1min)。则稀释倍数D和改变后的T和V1需重新代入公式计算。2.若测定管颜色与空白管颜色接近，即ΔA在零附近(小于0.01)，说明样本里面过氧化氢酶活性低，则可增加样本加样量V1(如增至50uL，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V1需重新代入公式计算。

结果计算：

1、标准曲线：y=0.1412x-0.0137：x为H2O2标准品(umoL)，y为ΔA。



2、按样本鲜重计算：

酶活定义：在25°C，每克组织每分钟催化分解1umoLH2O2定义为一个酶活单位(U)。

CAT(umoL/min/g 鲜重)=[(ΔA+0.0137)÷0.1412]÷(W×V1÷V)÷T×D

=141.6×(ΔA+0.0137)÷W×D

3、按样本蛋白浓度计算：

酶活定义：在25°C，每毫克组织蛋白每分钟催化分解 1umoLH2O2定义为一个酶活单位(U)

CAT(umoL/min/mg prot)=[(ΔA+0.0137)÷0.1412]÷(V1×Cpr)÷T×D

=141.6×(ΔA+0.0137)÷Cpr×D

4、按细胞数量计算：

酶活定义：在25°C，每10^4个细胞每分钟催化分解1umoLH2O2定义为一个酶活单位(U)。

CAT(umoL/min/10^4 cell)=[(ΔA+0.0137)÷0.1412]+(500×V1÷V)÷T×D

=0.283×(ΔA+0.0137)×D

5、按照液体体积计算：酶活定义：在25°C，每毫升液体每分钟催化分解1umoLH2O2定义为一个酶活单位(U)。

CAT(umoL/min/mL)=[(ΔA+0.0137)÷0.1412]÷V1÷T×D

=141.6×(ΔA+0.0137)×D

V----加入提取液体积，1mL;

V1----加入样本体积，0.01mL;

T----反应时间，5min;

W----样本质量，g;

500---细胞数量，万;

D---稀释倍数，未稀释即为1;

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。

附：标准曲线制作过程：

1、标准品浓度：试剂盒所带的标准品母液浓度为250mM。

2、把母液稀释成以下浓度：0,50,100,150,200,250mM。也可根据实际来调整浓度。

3、20uL标准品+80uL试剂一+100uL试剂三，混匀后，取10uL混合液，按照显色反应阶段测定管加3样体系操作，依据结果即可制作标准曲线。