

过氧化氢酶（CAT）活性检测试剂盒说明书

产品货号	产品名称	包装规格	测定方法
PMHA2-C24	过氧化氢酶(CAT)试剂盒	24T	常量法
PMHA2-C48		48T	常量法

一、测定意义

几乎所有的生物机体都存在过氧化氢酶。其普遍存在于能呼吸的生物体内，主要存在于植物的叶绿体、线粒体、内质网、动物的肝和红细胞中，在细胞中促进过氧化氢分解,使其不会进一步产生毒性很大的氢氧自由基,从而保护抗氧化酵素系统的功能作用,对于人体的生长发育和代谢活动亦具有重要意义。

二、测定原理

过氧化氢酶（Catalase）能够分解 H_2O_2 ，通过加入过量的钼酸铵而迅速中止，剩余的 H_2O_2 与钼酸铵反应生成淡黄色的络合物，在 405nm 处测定其变化量，可计算出 CAT 的活力。

三、试剂组成

试剂名称	试剂装量（24T）	试剂装量（48T）	保存条件
提取液	液体 30mL×1 瓶	液体 60mL×1 瓶	4℃ 保存
试剂一	液体 35mL×1 瓶	液体 70mL×1 瓶	4℃ 保存
试剂二	液体 3.5mL×1 瓶	液体 7mL×1 瓶	4℃ 保存
试剂三	粉剂 ×1 瓶	粉剂 ×2 瓶	4℃ 保存
	试剂三配制：用时加 35mL 水完全溶解，4℃ 保存一个月		
标准品 (1mol/L)	液体 1mL×1 瓶	液体 1mL×1 瓶	4℃ 保存

四、操作步骤

样本前处理

取一定量植物组织擦净水分及杂质，剪碎后放入研钵，加入液氮，研磨成粉状后转移出来，然后准确称重，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），旋涡混匀抽提 3-5 分钟或者使用组织破碎仪冰浴提取，8000g，4℃ 离心 10min，取上清，置冰上待测。

测定步骤

- 1、分光光度计预热 30min 以上，调节波长至 405nm，蒸馏水调零。
- 2、测定前将试剂一、试剂二 37℃ 温浴 10min 以上。
- 3、操作表

	对照管	测定管
粗酶液（mL）		0.05

试剂一 (mL)	0.5	0.5
试剂二 (mL)	0.05	0.05
混匀, 37°C 准确反应 10 分钟		
试剂三 (mL)	0.5	0.5
粗酶液 (mL)	0.05	

混匀, 0.5cm 光径比色皿, 405nm 波长, 双蒸水调零, 分光光度计测定各管吸光度值。 $\Delta A = A_{\text{对照管}} - A_{\text{测定管}}$ 。

五、过氧化氢酶活性计算

以吸光度值为横坐标, 过氧化氢浓度为纵坐标, 绘制标准曲线。过氧化氢的标准曲线 $y = 11.638x - 0.0045$, x 为吸光度值, y 为过氧化氢浓度 ($\mu\text{mol/mL}$), $R^2=0.9999$;

(1) 按样本蛋白浓度计算

单位定义: 每毫克组织蛋白每分钟分解 $1\mu\text{mol}$ 的 H_2O_2 的量为一个活力单位。

$$\text{计算公式: CAT (U/mgprot)} = (\Delta A \times 11.638 - 0.0045) \times V_{\text{反应}} \div (V_{\text{样}} \times \text{Cpr}) \div T = 2.2 \times (\Delta A \times 11.638 - 0.0045) \div \text{Cpr}$$

(2) 按样本鲜重计算

单位定义: 每克组织每分钟分解 $1\mu\text{mol}$ 的 H_2O_2 的量为一个活力单位。

$$\text{计算公式: CAT (U/g 鲜重)} = (\Delta A \times 11.638 - 0.0045) \times V_{\text{反应}} \div (W \times V_{\text{样}} \div V_{\text{样总}}) \div T = 2.2 \times (\Delta A \times 11.638 - 0.0045) \div W$$

$V_{\text{反应}}$: 反应体系总体积, 1.1mL;

$V_{\text{样}}$: 加入样本体积, 0.05mL;

$V_{\text{样总}}$: 加入提取液体积, 1 mL;

T: 反应时间, 10min;

Cpr: 样本蛋白质浓度, mg/mL;

W: 样本质量, g;

六、计算举例

取一定量的新鲜苦瓜叶片, 液氮研磨后, 准确称取 0.1g 粉末, 加入 1mL 提取液, 混匀抽提 3 分钟提取, 8000g, 4°C 离心 10min, 制备粗酶液, 按照操作步骤操作。测得对照管 OD 值为 0.6097, 测得测定管为 0.3665。将测得数据带入计算公式中:

$$\begin{aligned} \text{CAT (U/g 鲜重)} &= 2.2 \times ((0.6097 - 0.3665) \times 11.647 - 0.0045) \div 0.1 \\ &= 62.22 \text{ U/g} \end{aligned}$$

七、注意事项

- 1、样本测试前请选取 2 个预期差异最大的样本, 稀释成不同浓度进行预试, 以选取

最佳取样浓度；

- 2、若对照孔OD值减去测定孔OD值高于0.4时，可将样本用提取液进行稀释，计算时乘以相应的稀释倍数即可；若测定孔OD值减去对照孔OD值低于 0.01 时，可以增加样本取样量或者取样浓度。
- 3、过氧化氢的标准曲线不同操作条件下，可能存在差异。可以自行按照附录I进行相关检测。

八、公司介绍

陌凡生物科技有限公司是一家专业从事转基因检测、食品安全以及动植物疫病检测为核心业务的生物科技公司。能够为客户提供动植物疫病检测试剂、小分子抗原抗体、植物激素、植物抗体、重组蛋白等优质产品。自主研发了涵盖分子生物学、细胞生物学、免疫学、生物医学等领域的各种试剂盒。产品覆盖面广，品质可靠。

附录 I 过氧化氢标准曲线的制备

1、前处理：

将 1mol/L 的标准品用蒸馏水稀释成 0、5、10、20、50、100 $\mu\text{mol/mL}$ 标准液进行标准曲线的制备。

2、操作表：

过氧化氢浓度 ($\mu\text{mol/mL}$)	0	5	10	20	50	100
试剂一 (mL)	0.5	0.5	0.5	0.5	0.5	0.5
不同浓度过氧化氢 (mL)	0.05	0.05	0.05	0.05	0.05	0.05
试剂三 (mL)	0.5	0.5	0.5	0.5	0.5	0.5
测定吸光度值	0.039	0.0603	0.0806	0.1234	0.2454	0.4486
绝对吸光度值	0	0.0205	0.0408	0.0836	0.2056	0.4088
过氧化氢终浓度 ($\mu\text{mol/mL}$)	0	0.24	0.48	0.95	2.38	4.76

过氧化氢浓度为纵坐标，绝对吸光度值为横坐标，拟合标准曲线。

