

过氧化氢酶（CAT）检测试剂盒

（货号：SH3001 酶标法 96T）

一、产品简介

过氧化氢酶（CAT，EC 1.11.1.6）是一种存在于所有好氧生物（包括植物、动物和微生物）体内的关键抗氧化酶。它的核心功能是催化过氧化氢（ H_2O_2 ）分解为水和氧气，从而保护细胞免受氧化损伤。细胞在正常代谢（如光合作用、呼吸作用）以及逆境胁迫下会持续产生 H_2O_2 。CAT 通过及时清除 H_2O_2 ，防止其通过芬顿反应（Fenton reaction）生成毒性更强的羟基自由基（ $\cdot OH$ ），从而保护脂质膜、蛋白质和 DNA 免受氧化损伤。

二、检测原理

对于一定量的 H_2O_2 ，过氧化氢酶可以催化 H_2O_2 产生水和氧气，剩余的 H_2O_2 与一种显色底物反应，产生红色产物，在 510nm 处有最大吸收峰。通过计算 H_2O_2 减少量来计算样本中过氧化氢酶的活力。

三、试剂盒组分与规格

试剂名称	规格	保存条件	备注
提取液	液体 100mL×1 瓶	4℃保存	
试剂一	液体 25mL×1 瓶	4℃保存	
试剂二	液体 200μL×1 支	4℃保存	使用前甩几下或离心使试剂落入底部，取 20μL 至 2mL EP 管中，加入 1.31mL 蒸馏水混匀备用。
试剂三	液体 50mL×1 瓶	4℃保存	
试剂四	液体 1mL×1 瓶	4℃保存	
试剂五	液体 1mL×1 瓶	4℃保存	
标准品	液体 200μL×1 支	4℃保存	

四、所用到的仪器和用品

酶标仪、台式离心机、可调式移液器、96 孔板、匀浆器、冰和蒸馏水。

五、过氧化氢酶（CAT）活性测定



正式实验前务必选取 2-3 个预期差异较大的样本做测定, 了解本批样本情况, 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, 在 4°C 12000g 离心 10min, 取上清, 置冰上待测。

【注】若增加样本量, 可以按照组织质量(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; 按照细菌或细胞数量(10^4 个): 提取液体积(mL)为 500~1000: 1 的比例(建议 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 20%或 200W, 超声 3s, 间隔 10s, 重复 30 次); 12000g 4°C离心 10min, 取上清, 置冰上待测。

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试剂二先按照试剂配制要求配好, 再进行一下操作。

③先检测空白管(仅做一次): 40μL 试剂一+10μL 试剂二+450μL 试剂三, 立即混匀后取 10μL, 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, 可以分批检测样本。

⑤在 EP 管中依次加入:

试剂名称 (μL)	测定管
样本	10
试剂一	30
试剂二	10
混匀, 室温 25°C准确反应 5min。(观察有气泡产生, 酶活性越大, 则气泡越多。)	
试剂三	450ul
混匀后, 立即取 10μL 混合液进行第⑥步测试。(若浑浊, 则需 8000g 4°C离心 10min, 取上清液。)	

⑥显色反应:

可根据使用量将试剂一、试剂四、试剂五按 170μL: 10μL: 10μL 的比例事先混合。

试剂名称 (μL)	测定管
混合液	10
试剂一	170
试剂四	10
试剂五	10
混匀, 室温 25°C 反应 1min, 510nm 处测定吸光值 A, $\Delta A = A$ 空白-A 测定。	

【注】: 应用本试剂盒, 当 ΔA 过大或过小时, 建议将样本进行稀释或增加样本量进行测试。

六、结果计算

- 1、根据标准曲线, 计算 ΔA 对应的 H_2O_2 浓度 C(单位为 $\mu\text{mol/L/ml}$)。例如本说明书中的标准曲线为 $y = 0.0129x + 0.0065$, 则 $C = (\Delta A - 0.0065) / 0.0129$ 。

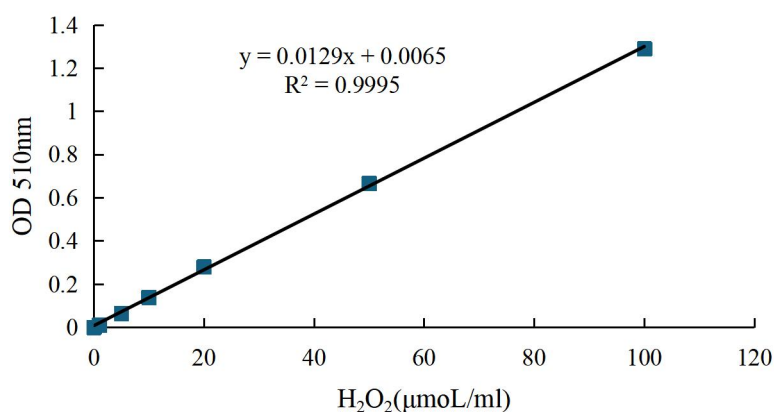


图 1 过氧化氢酶检测试剂盒的标准曲线效果图, 图中数据仅供参考。

- 2、按样本鲜重计算:

单位定义: 在 25°C, 每克组织每分钟催化分解 1μmol H_2O_2 定义为一个酶活单位 (U)。

$$\text{CAT}(\mu\text{mol/min/g 鲜重}) = C \times V_1 \div (W \times V_1 \div V) \div T \times D$$

- 3、按样本蛋白浓度计算:

单位定义: 在 25°C, 每毫克组织蛋白每分钟催化分解 1μmol H_2O_2 定义为一个酶活单位 (U)。

$$\text{CAT}(\mu\text{mol/min/mg prot}) = C \times V_1 \div (V_1 \times C_{pr}) \div T \times D$$

- 4、按细胞数量计算:

单位定义: 在 25°C, 每 10⁴ 个细胞每分钟催化分解 1μmol H_2O_2 定义为一



个酶活单位 (U)。

$$\text{CAT}(\mu\text{mol}/\text{min}/10^4 \text{ cell}) = C \times V1 \div (500 \times V1 \div V) \div T \times D$$

5、按照液体体积计算：

单位定义：在 25℃，每毫升液体每分钟催化分解 1μmol H₂O₂ 定义为一个酶活单位 (U)。

$$\text{CAT}(\mu\text{mol}/\text{min}/\text{mL}) = C \div T \times D$$

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，推荐使用本公司的 BCA 蛋白含量检测试剂盒（货号：AR0146）。

七、标准曲线制作过程

- 1、制备标准品母液（200mM）：临用前取出 10μL 标准品溶解在 0.49mL 水中，充分混匀（现配现用）。
- 2、将母液用蒸馏水稀释成以下浓度：0，10，20，50，100，150，200mM。也可以根据实际情况调整浓度。
- 3、10μL 标准品+40μL 试剂一+450μL 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。