# 过氧化氢酶（CAT）检测试剂盒（微量法）

**货号：**PMK1037BKM

**保存：**-20℃避光保存 12 个月

**规格：**48T/48S 96T/96S 2×96T/192S

**适用样本：**动植物组织、细胞、血清（浆）等液体样本

**产品简介**

过氧化氢酶（Catalase, CAT, EC 1.11.1.6）是一种常见的抗氧化酶，可催化过氧化氢（$H_2O_2$）分解为水和氧，普遍存在于含有细胞色素系统的好氧细胞中。过氧化氢对细胞是高度有害的，其积累将导致细胞靶标（例如 DNA，蛋白质和脂质）的氧化，从而导致诱变和细胞死亡。通过使用过氧化氢酶从细胞中去除过氧化氢（$H_2O_2$），可以防止细胞的氧化损伤。过氧化氢酶在氧化应激相关疾病中的作用已被广泛研究。过氧化氢酶还表现出过氧化物酶活性，其中低分子量醇可用作电子供体。脂肪醇是过氧化氢酶的特异性底物，然而，具有过氧化活性的其它酶不利用这些底物。本试剂盒提供了一种简单易用的比色法，用于分析不同生物样品中过氧化氢酶活性。原理是利用过氧化氢酶的过氧化物酶功能来测定过氧化氢酶的活性。在合适浓度的 $H_2O_2$ 存在的条件下，过氧化氢酶与甲醇反应，产生甲醛，生成的甲醛可以与显色物反应，产物可以在 540nm 处测量吸光度，样本中的过氧化氢酶活性与 OD 值成正比。

**产品内容**

| 试剂盒组分 | 规格 | | | 储存条件 |
|---|---|---|---|---|
| | 48T | 96T | 2×96T | |
| 提取液（10×） | 5mL | 10mL | 20mL | 4℃ |
| 样本稀释液（10×） | 5mL | 10mL | 20mL | 4℃ |
| 反应缓冲液（10×） | 5mL | 10mL | 20mL | 4℃ |
| 试剂一 | 2mL | 4mL | 8mL | 4℃ |
| 试剂二 | 2mL | 4mL | 8mL | 4℃ |
| 试剂三 | 0.5mL | 1mL | 2mL | -20℃ |
| 试剂四 | 2mL | 4mL | 8mL | -20℃避光保存 |
| 试剂五 | 1mL | 2mL | 4mL | 4℃ |
| 甲醛标准品（4.25M） | 100μL | 100μL | 200μL | 4℃ |

**自备耗材**

酶标仪或可见分光光度计（能测 540nm 处的吸光度）
96 孔板或微量玻璃比色皿、可调节式移液枪及枪头
离心机
去离子水
匀浆器（如果是组织样本）

**试剂准备**

**注意：各组分（小管试剂）开盖前，请先低速离心。**
**提取液 （1×）：**去离子水 1:10 稀释后（5mL 10×提取液+45mL 去离子水），可在 4℃保存至少两个月。

**样本稀释液（1×）：**样本稀释液（10×）去离子水 1:10 稀释后（5mL 10×样本稀释液+45 mL 去离子水），可用来稀释甲醛标准品和样本。该工作液可在 4℃保存至少两个月。
**反应缓冲液（1×）：**反应缓冲液（10×）去离子水 1:10 稀释后（2mL 10×反应缓冲液+18 mL 去离子水），可在 4℃保存至少两个月。
**试剂一：**即用型；使用前，平衡到室温；4℃保存。
**试剂二：**即用型；使用前，平衡到室温；4℃保存。
**试剂三：**用 9.96 mL 去离子水稀释 40 μL 试剂三。稀释后的试剂三溶液可保存 2 h。
**试剂四：**即用型；使用前，平衡到室温；4℃保存。
**试剂五：**即用型；使用前，平衡到室温；4℃保存。
**标准品制备：**用 9.99 mL 1×样本稀释液稀释 10 μL 甲醛标准品，得到 4.25mM 的储存液。按下表所示，进一步稀释标准品。

| 标准品编号 | 4.25 mM 甲醛储存液体积（μL） | 1×样本稀释液体积（μL） | 甲醛终浓度（μM） |
|---|---|---|---|
| 1 | 4 | 996 | 2 |
| 2 | 10 | 990 | 5 |
| 3 | 30 | 970 | 15 |
| 4 | 60 | 940 | 30 |
| 5 | 90 | 910 | 45 |
| 6 | 120 | 880 | 60 |
| 7 | 150 | 850 | 75 |

**注意：终浓度 是指在 170 μL 反应体系里的终浓度。**

**样本制备**

动植物组织：称取 0.1g 组织加入 1 mL1×预冷的提取液将样本进行匀浆。匀浆后的样本，在 4℃ 10,000g 离心 15min，取上清液做进一步分析。
细胞：收集 $5\times10^6$ 个细胞加入 1mL 预冷的 1×提取液，冰上匀浆，在 4℃ 10,000 g 离心 15min，取上清液做进一步分析。
血清、血浆：按常规方法收集血清，1×样本稀释液稀释后即可作为血清样本进行检测；用抗凝管收集血液，颠倒混匀。4℃ 600g 离心 10min，移取上清至另一新的离心管中，适量 1×样本稀释液稀释后即可作为血浆样本进行检测。
**注意：建议使用新鲜样本。如果不立即使用，可将样品在-80℃下保存一个月。如需测定蛋白浓度，推荐使用 BCA 蛋白质定量试剂盒进行样本蛋白质浓度测定。**

**实验步骤**

1. 酶标仪或可见分光光度计预热 30 min 以上，调节波长到 540nm，可见分光光度计去离子水调零。
2. 在 96 孔板或 EP 管中按照如下方式加样：

| 试剂（μL） | 空白 | 标准 | 测定 |
|---|---|---|---|
| 1×反应缓冲液 | 100 | 100 | 100 |
| 试剂一 | 30 | 30 | 30 |
| 1×样本稀释液 | 20 | 0 | 0 |
| 标准品 | 0 | 20 | 0 |
| 样本 | 0 | 0 | 20 |
| 稀释后的试剂三 | 20 | 20 | 20 |

| | | | |
|---|---|---|---|
| 充分混匀，室温孵育 20min | | | |
| 试剂二 | 30 | 30 | 30 |
| 试剂四 | 30 | 30 | 30 |
| 充分混匀，室温孵育 10min | | | |
| 试剂五 | 10 | 10 | 10 |

3. 充分混匀，室温孵育 5min，测定 540nm 处的吸光值 A（如有明显气泡可吸取清液 200uL 到新的 96 孔板或微量玻璃比色皿中，再进行测定，注意不要吸到上层气泡）。计算 $\Delta A_{测}=A_{测定}-A_{空白}$，$\Delta A_{标}=A_{标准}-A_{空白}$。

**注意：实验之前建议选择 2-3 个预期差异大的样本做预实验，如果 $\Delta A_{测}$ 大于 1.2，样本可用 1×样本稀释液进一步稀释，计算结果乘以稀释倍数；如果 $\Delta A_{测}$ 小于 0.01，可增加样本量进行检测。**

**结果计算**

1. 标准曲线绘制：

以甲醛标准溶液终浓度(μM)为 y 轴，$\Delta A_{标}$ 为 x 轴，绘制标准曲线（浓度为 y 轴更方便计算结果）。

2. 根据标曲计算样本产生的甲醛浓度

甲醛(μM)=y×(0.17mL÷0.02mL)=8.5×y。μM 即μmol/L=1nmol/mL

3. 样本 CAT 活性计算

（1）按样本鲜重计算

活性单位的定义：25℃环境下，每 g 组织每分钟产生 1nmol 甲醛定义为一个酶活力单位。

CAT(U/g 鲜重)＝8.5×y÷W÷T×n=4.25×y×n

（2）按细胞数量计算

单位的定义：25℃环境下，每 1 万个细胞每分钟产生 1nmol 甲醛定义为一个酶活力单位。

$CAT(U/10^4\ cell)$＝8.5×y÷细胞数量÷T×n＝8.5×y÷500÷T×n=0.00085×y×n

（3）按液体样本体积计算

单位的定义：25℃环境下，每 mL 液体样本每分钟产生 1nmol 甲醛定义为一个酶活力单位。

CAT(U/mL)＝8.5×y÷T×n=0.425×y×n

（4）按样本蛋白浓度计算

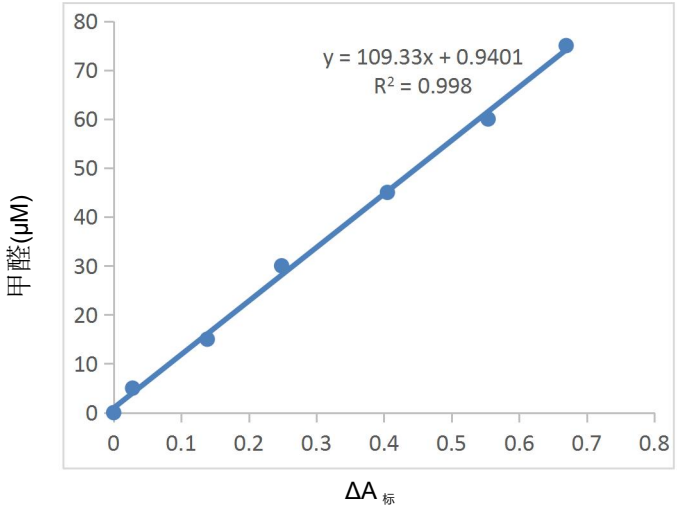
单位的定义：25℃环境下，每 mg 组织蛋白每分钟产生 1nmol 甲醛定义为一个酶活力单位。

CAT(U/mg prot)＝8.5×y÷Cpr÷T×n =0.425×y÷Cpr×n

W：样品质量，0.1g；T：反应时间，20min；n：样本稀释倍数；500：细胞数量，500 万；$V_{样}$：加入样本体积，0.02mL；Cpr：样本蛋白质浓度，mg/mL。

**结果展示**

典型标准曲线-以下数据和曲线仅供参考，实验者需根据自己的实验建立标准曲线。



**注意事项**

1. 实验过程中请穿戴实验服、口罩和乳胶手套。请按照生物实验室的国家安全规定进行实验，尤其是在检测血样或其他体液时。
2. 本试剂盒仅用于实验室科学研究，如果本试剂盒用于临床诊断或任何其他用途，我们将不对任何后果负责。
3. 本试剂盒应在有效期内使用，并请严格按照说明书进行存储。
4. 不同批次号、不同厂家之间的组分不要混用；否则，可能导致结果异常。
5. 勤换吸头，避免各组分之间的交叉污染。

**相关产品：**

PMK1038BKM 过氧化物酶（POD）检测试剂盒（微量法）
PMK1036BKM 超氧化物歧化酶（SOD）检测试剂盒（微量法）
PMK1040BKM 丙二醛（MDA）检测试剂盒（微量法）

**更多产品详情了解，请关注公众号：**