

过氧化氢酶 (Catalase, CAT) 试剂盒(钼酸铵法)

微板法

本试剂盒仅供体外研究使用，不用于临床诊断

使 用 说 明 书

货号: BP10476W

有效期: 6个月

规格: 48T(23S)/96T(47S)

保存温度: 2-8°C/常温

实验原理：

过氧化氢能氧化 MoO_4^{2-} 成 MoO_5^{2-} ， MoO_5^{2-} 接受氢氧根的电子成键，分子间立即脱水缩合，得到稳定的黄色复合物 $(\text{H}_2\text{MoO}_4 \cdot \text{XH}_2\text{O})_n$ 在 405nm 处有强烈吸收峰，其吸光值和过氧化氢浓度成线性关系。测定出体系剩余过氧化氢在 405nm 的吸光值即可反映 CAT 的催化活性。

检测范围：1-150 $\mu\text{mol}/\text{mL}$ ，灵敏度：1 $\mu\text{mol}/\text{mL}$

注意事项：

1. 不能使用过期产品，不同货号 and 批号组分不得混用。
2. 实验中请穿着实验服并戴乳胶手套做好防护工作。
3. 如果可能传播疾病，所有的样品都应管理好，按照规定的程序处理样品和检测装置。
4. 试剂严格按保存条件保存，不同测试盒中的试剂不能混用。对于体积较少的试剂，使用前请先离心，以免量取不到足够量的试剂。试剂盒中如有提供粉剂，使用前请甩几下，使粉剂落入底部。

产品组成:

试剂名称	规格 (48T/23S)	规格 (96T/47S)	保存条件
提取液	50mL×1 瓶	100mL×1 瓶	2-8°C
试剂一 (标准品)	5mL×1 瓶	10mL×1 瓶	2-8°C, 避光
试剂二	7.5mL×1 瓶	15mL×1 瓶	常温
试剂三	15mL×1 瓶	30mL×1 瓶	2-8°C

所需仪器耗材及试剂:

离心机、酶标仪、96 孔板、可调式移液器、恒温箱、蒸馏水。

样本处理及要求:

1. **试剂盒检测范围不等同于样本中待测物的浓度范围**，建议实验前选择 2-3 个预期差异大的样本做预测定，根据预实验的结果，结合本试剂盒的线性范围：1-150 μ mol/mL，如果样品中待测物浓度过高或过低，请对样本做适当的稀释或浓缩，样本稀释液为提取液。
2. 若所检样本不在说明书所列样本类型之中，建议做预实验验证其检测有效性。
3. **细菌或培养细胞样本**：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)；10000 g，4 $^{\circ}$ C 离心 10min，取上清，置冰上待测。
4. **组织样本**：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)，进行冰浴匀浆。10000 g，4 $^{\circ}$ C 离心 10min，取上清，置冰上待测。
5. **血清 (浆) 等液体样本**：直接测定。若浑浊，离心后取上清测定。

检测前准备工作:

1. 请提前取出试剂盒，平衡至室温。
2. **标准品溶液的配置**：标准品母液浓度为 $500\mu\text{mol/mL}$ ，临用前取一支试剂一用蒸馏水稀释 5 倍，即浓度为 $100\mu\text{mol/mL}$ 标准品溶液。
3. **试剂二**：过饱和试剂，如有结晶析出，可 37°C 加热搅拌溶解。
4. **试剂三**：过饱和试剂，如有絮状沉淀，可 37°C 加热搅拌溶解。

操作步骤:

1. 酶标仪预热 30min 以上, 调节波长至 405nm。
2. 样本测定 (在 EP 管中依次加入)

试剂名称(μL)	标准管	空白管	测定管	对照管
100 $\mu\text{mol}/\text{mL}$ 标准品	50		50	
提取液	30	30		
蒸馏水		50		50
样本			30	30
混匀, 25 $^{\circ}\text{C}$ 准确反应 10min				
试剂二	100	100	100	100
试剂三	265	265	265	265
混匀, 取 200 μL 于 96 孔板立即测定各管在 405nm 处的 OD 值。				

注:

1. 每个测定管需设一个对照管。
2. 预实验若发现酶活性过高 ($A_{\text{测定}} < 0.1$), 可用提取液适当稀释样品后测定, 并在计算公式中乘以相应稀释倍数。
3. 若 $A_{\text{对照}} > A_{\text{测定}}$, 一方面可能是酶活性过低, 可将反应时间 10min 延长到 30min, 另一方面可能样本中杂质干扰严重, 可将样本稀释 5 倍左右后测定, 并在计算公式中代入实际反应时间和乘以相应稀释倍数。

实验结果结算:

1. 血清 (浆) CAT 活力的计算:

单位的定义: 在 25°C条件下, 每 mL 血清 (浆)每分钟催化 1 μ molH₂O₂ 降解定义为一个酶活力单位。

$$\text{CAT (U/mL)}=(\Delta A_2 \div \Delta A_1) \times C_{\text{标准}} \times V_{\text{标准}} \div V_{\text{样}} \div T \times N=16.67 \times (\Delta A_2 \div \Delta A_1) \times N$$

2. 组织、细菌或细胞中 CAT 活力计算:

(1) 按样本蛋白浓度计算:

单位的定义: 在 25°C条件下, 每 mg 组织蛋白每分钟催化 1 μ molH₂O₂ 降解定义为一个酶活力单位。

$$\text{CAT (U/mg prot)}=(\Delta A_2 \div \Delta A_1) \times C_{\text{标准}} \times V_{\text{标准}} \div (C_{\text{pr}} \times V_{\text{样}}) \div T \times N=16.67 \times (\Delta A_2 \div \Delta A_1) \div C_{\text{pr}} \times N$$

(2) 按样本质量计算:

单位的定义: 在 25°C条件下, 每 g 组织每分钟催化 1 μ molH₂O₂ 降解定义为一个酶活力单位。

$$\text{CAT(U/g 质量)}=(\Delta A_2 \div \Delta A_1) \times C_{\text{标准}} \times V_{\text{标准}} \div (V_{\text{样}} \div V_{\text{样总}} \times W) \div T \times N=16.67 \times (\Delta A_2 \div \Delta A_1) \div W \times N$$

(3) 按细菌或细胞数量计算:

单位的定义: 在 25°C条件下, 每 1 万个细菌或细胞每分钟催化 1 μ molH₂O₂ 降解定义为一个酶活力单位。

$$\text{CAT (U/10}^4\text{cell)}=(\Delta A_2 \div \Delta A_1) \times C_{\text{标准}} \times V_{\text{标准}} \div (V_{\text{样}} \div V_{\text{样总}} \times 500) \div T \times N=0.0167 \times (\Delta A_2 \div \Delta A_1) \times N$$

注:

ΔA_1 : 标准管 OD 值-空白管 OD 值 ΔA_2 : 测定管 OD 值-对照管 OD 值

$C_{\text{标准}}$: 标准品浓度, $100\mu\text{mol/mL}$

$V_{\text{标准}}$: 加入标准品体积, 0.05mL

$V_{\text{样}}$: 加入样本体积, 0.03mL

T: 反应时间, 10min

C_{pr} : 样本蛋白质浓度, mg/mL

N: 样本稀释倍数

W: 样品质量, g

$V_{\text{样总}}$: 加入提取液体积, 1mL

500: 细胞或细菌总数, 500 万

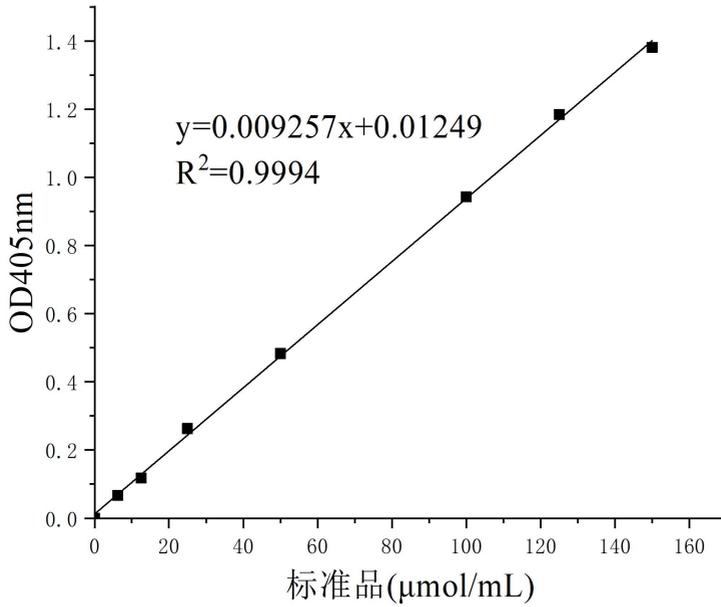
参考样本数据：

以下数据仅供参考：

样本类型	稀释倍数	参考值
人血清	不稀释	13.964U/mL
绿萝 (10%匀浆)	不稀释	3.535U/g

参考曲线:

$y=0.009257x+0.01249, R^2=0.9994$, x 是标准品的浓度 ($\mu\text{mol/mL}$), y 是 ΔA 。



注意：标准曲线仅供参考，用户不用制作。