

过氧化氢酶 (Catalase, CAT) (钼酸铵法) 检测试剂盒微板法

使用说明书

产品货号: BP10476W

注意: 请在试剂盒保质期内使用, 具体保质期见外包装标签。

本产品仅供科学研究使用, 不能用于临床诊断。

检测范围: 1-150 $\mu\text{mol/mL}$

灵敏度: 1 $\mu\text{mol/mL}$

有效期: 6 个月

保存温度: 2-8 $^{\circ}\text{C}$ 和常温

检测原理:

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。

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。

试剂盒组分：

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℃
试剂一（标准品）	5mL×1 瓶	10mL×1 瓶	2-8℃，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℃

所需仪器耗材及试剂：

离心机、酶标仪、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: $1-150 \mu\text{mol/mL}$, 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°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°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. **标准品溶液的配制:** 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 $\mu\text{mol/mL}$ 标准品	50		50	
提取液	30	30		
蒸馏水		50		50
样本			30	30
混匀，25°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。

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℃ 条件下，每 mL 血清（浆）每分钟催化 $1 \mu\text{molH}_2\text{O}_2$ 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℃ 条件下，每 mg 组织蛋白每分钟催化 $1 \mu\text{molH}_2\text{O}_2$ 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℃ 条件下，每 g 组织每分钟催化 $1 \mu\text{molH}_2\text{O}_2$ 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℃ 条件下，每 1 万个细菌或细胞每分钟催化 $1 \mu\text{molH}_2\text{O}_2$ 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

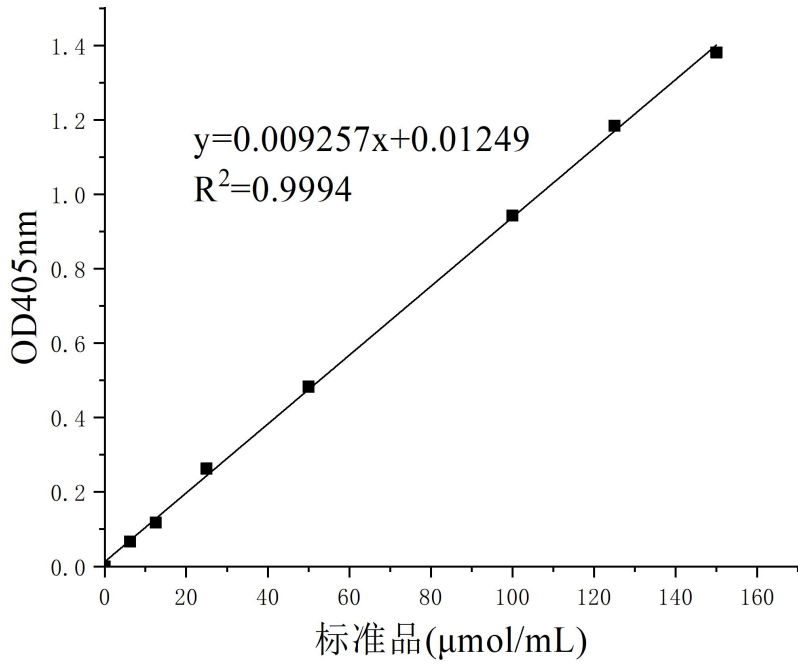
Cpr：样本蛋白质浓度， mg/mL N：样本稀释倍数

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。