过氧化氢酶（CAT）检测试剂盒

货号：RBC0019

规格：86S

检测范围：2-75μM

检测波长：540nm

检测时间：35min

适用样本：动植物组织、细胞、血清（浆）等液体样本

使用前请仔细阅读说明书，预实验后再进行批量试验

如有任何问题，可以通过以下方式联系我们：

销售部电话：027-65316809

技术部电话：153-42250750

官方网站：www.reedbio.cn

一、实验原理：

本试剂盒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。

二、试剂盒组分与保存（试剂盒保质期 6 个月）

试剂名称	规格	保存条件
提取液（10×）	10mL	4℃
样本稀释液（10×）	10mL	4℃
反应缓冲液（10×）	10mL	4℃
试剂一	4mL	4℃
试剂二	4mL	4℃
试剂三	1mL	-20℃
试剂四	4mL	-20℃避光
试剂五	2mL	4℃
甲醛标准品（4.25M）	100μL	4℃
提取液（10×）	10mL	4℃

三、需自备的仪器和用品：

酶标仪(**540nm**)、台式离心机、研钵/匀浆器、超声清洗机、天平、可调式移液器、冰和蒸馏水。

样本制备参考附录

四、操作步骤：

1. **预实验**注意事项：

1）实验之前建议选择 2 个预期差异大的样本和标准曲线（6 个孔，分别为 S1-S6）做预实验，2 个空白孔，一共 10 个孔，**正式实验无需重新做标曲和空白孔**。

2) 若预实验测定吸光值超出标准吸光值线性范围，样本可用稀释液进一步稀释，避免实验样本和试剂浪费！

1. **提取液（1X）**配制：

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。

2. **样本稀释液（1×）**配制：

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。

3. **反应缓冲液（1×）**配制：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。

4. **试剂三**的配制：

用 9.99 mL 去离子水稀释 10 μL 甲醛标准品。稀释后的试剂三溶液可保存 2 h。

5. **标准品**的配制：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，记为 S0。按下表所示，进一步稀释标准品。

编号	标准品储存液体(μL)	样本稀释液体(μL)	稀释后浓度（μM）
S1	4μL S0	996	2
S2	10μL S0	990	5
S3	30μL S0	970	15
S4	60μL S0	940	30
S5	90μL S0	910	45
S6	120μL S0	880	60
S7	120μL S0	850	75

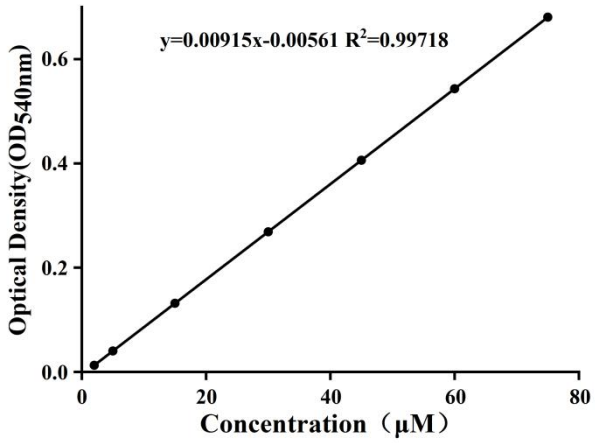
6. 实验步骤及结果计算：

1) 酶标仪预热 30min 以上，调节波长至 **540nm**。

2) 操作表：

试剂名称（μL）	标准孔	空白孔	测定孔
反应缓冲液（1×）	100	100	100
试剂一	30	30	30
样本稀释液（1×）	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
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 200μL 到新的 96 孔板中，再进行测定，注意不要吸到上层气泡）。计算$\Delta A_{测}=A_{测定}-A_{空白}$，$\Delta A_{标}=A_{标准}-A_{空白}$。			

3) 结果计算

<table>
<tr><td>以甲醛标准溶液终浓度(μM)为 x 轴，ΔA 标为 y 轴，绘制标准曲线。将$\Delta A_{测}$带入方程得到 x（μM，μM=nmol/mL）</td><td> 
</td></tr>
<tr><td colspan="2">不同检测条件下，实际读数因标准品的配制、检测仪器等不同而存在差异，图中数据仅供参考！</td></tr>
<tr><td>按样本鲜重计算</td><td>CAT(U/g 鲜重) = 4.25*x*N</td></tr>
<tr><td>按细胞数量计算</td><td>CAT(U/10^4 cell) = 0.00085*x*N</td></tr>
<tr><td>按样本蛋白浓度计算</td><td>CAT(U/mg prot) = 0.425*x÷Cpr*N</td></tr>
<tr><td>按液体体积计算</td><td>CAT(U/mL)=0.425*x*N</td></tr>
<tr><td colspan="2">N:样本稀释倍数；
Cpr：样本蛋白质浓度，mg/mL</td></tr>
</table>

注：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*x÷W÷T*N=4.25*x*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。

$$CAT(U/10^4\ cell) = 8.5*x÷细胞数量÷T*N = 8.5*x÷500÷T*N=0.00085*x*N$$

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。

$$CAT(U/mL) = 8.5*x÷T*N=0.425*x*N$$

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。

$$CAT(U/mg\ prot) = 8.5*x÷Cpr÷T*N =0.425*x÷Cpr*N$$

8.5：标准品和样本的上样量 20μL,反应体系 170μL,这里稀释了 8.5 倍（170÷20）；

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。

附录（样本处理）:

1. 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。
2. 细胞：收集 5×10^6 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。
3. 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。

技术资源

微信扫描左下二维码，获得更详细的实验指南和常规问题分析如有任何技术问题，请与我司联系(建议及时对显色结果拍照，保留实验数据以及未使用的试剂)。