

过氧化氢酶 (CAT) 检测试剂盒

(货号: BC013 可见光法)

一、测定意义及原理

过氧化氢酶 (CAT) 分解 H_2O_2 的反应可通过加入钼酸铵而迅速中止, 剩余的 H_2O_2 与钼酸铵作用产生一种淡黄色的络合物, 在 405nm 处测定其变化量, 可计算出 CAT 的活力。

二、试剂组成及配制 (96T)

	组分	96T(100Assay)	储存
试剂一	液体	100ml*1 瓶	4°C 保存 6 个月
试剂二	底物溶液	10ml*1 瓶	4°C 保存 6 个月
试剂三	显色粉剂	1 瓶	4°C 保存 6 个月
试剂三配制方法: 加双蒸水至 100ml 溶解, 4°C 保存一个月, (如若底部有不溶粉末沉淀, 直接取上清使用, 不影响测定结果。)			
试剂四	液体	10ml*1 瓶	4°C 保存 6 个月
试剂四天冷时会发生凝固现象, 使用前 37°C 水浴至透明即可使用			

三、操作过程:

(一)、血清 (浆) 的检测:

1、操作表 (如):

	对照管	测定管
血清 (浆) (ml)		0.1
试剂一 (37°C 预温) (ml)	1.0	1.0
试剂二 (37°C 预温) (ml)	0.1	0.1
混匀, 37°C 准确反应 1 分钟 (60 秒, 不能多, 也不能少)		
试剂三 (ml)	1.0	1.0
试剂四 (ml)	0.1	0.1
血清 (浆) (ml)	0.1	

混匀, 波长 405nm, 光径 0.5cm, 双蒸水调零, 测定各管吸光度值。

注: 一般样本没有溶血、脂血等显著差异情况, 对照管的样本变更为双蒸水, 做 1~2 管对照即可; 如需做样本自身对照, 则试剂盒所测定样本数量减至 48 样。

2、血清中的 CAT 活力的计算:

(1) 定义: 每毫升血清或血浆每秒钟分解 $1\mu\text{mol}$ 的 H_2O_2 量为一个活力单位。

(2) 计算公式:

$$\text{血清中 CAT 活力 (U/ml)} = (\text{对照 OD 值} - \text{测定 OD 值}) \times 271^* \times \frac{1}{60 \times \text{取样量}} \times \text{样本测试前稀释倍数 (N 倍)}$$

注: * 271 为斜率的倒数



[注]:为方便操作, 您可将测试前的准备工作做好, 编好试管, 加入样本 0.1ml 及试剂一 1ml 然后将所有的管子均放入 37°C 水浴箱中预温 3-5 分钟。测试时, 管中加入试剂二 0.1ml, 同时准确记时, 并立即混匀, 放入 37°C 水浴中, 当反应到 1 分钟时立即加入显色剂终止反应, 混匀。依次再测第二、第三…对照管和测定管。每次均要将对照管及测定管同时测定。

(二)、全血的检测:

1、1: 99 溶血的制备: 取 50μl 全血加双蒸水至 5ml 充分混匀后放置 10min, 待测。

2、操作表:

	空白对照管	测定管	自身对照管
双蒸水 (ml)	0.05		2.1
1: 99 溶血液(ml)		0.05	0.05
试剂一 (37°C 预温) (ml)	1.0	1.0	
试剂二 (37°C 预温) (ml)	0.1	0.1	
混匀, 37°C 准确反应 1 分钟 (60 秒)			
试剂三 (ml)	1.0	1.0	

混匀, 波长 405nm, 光径 0.5cm, 双蒸水调零, 测定各管吸光度值。

3、血红蛋白中 CAT 活力的计算:

(1) 定义: 每毫克血红蛋白每秒钟分解 1μmol 的 H₂O₂ 的量为一个活力单位。

$$\text{全血中CAT活力 (U/mgHb)} = (\text{空白对照OD值} + \text{自身对照OD值} - \text{测定OD值}) \times 271^* \times \frac{1}{60 \times \text{取样量}} \div \frac{\text{血红蛋白含量 (mgHb/ml)}}{1}$$

注: * 271 为斜率的倒数

(三) 组织样本的检测:

1、组织匀浆液的制备: 准确称取组织重量, 按重量 (g) : 体积 (ml) = 1:9 的比例加入 9 倍体积的生理盐水, 冰水浴条件下, 制备成 10% 的组织匀浆, 2500 转/分离心 10 分钟, 取上清, 再用生理盐水稀释成最佳取样浓度, 待测 (最佳取样浓度摸索见附录)。

2、操作表:

	对照管	测定管
组织匀浆 (ml)		0.05
试剂一 (37°C 预温) (ml)	1.0	1.0
试剂二 (37°C 预温) (ml)	0.1	0.1
混匀, 37°C 准确反应 1 分钟 (60 秒)		
试剂三 (ml)	1.0	1.0
试剂四 (ml)	0.1	0.1
组织匀浆 (ml)	0.05	

混匀, 波长 405nm, 光径 0.5cm, 双蒸水调零, 测定各管吸光度值。

注: 一般样本没有高脂等导致显著差异情况, 对照管的样本更换成双蒸水, 做 1~2 管对照即可。如需做样本自身对照, 则试剂盒所测定样本数量减至 48 样。



3、组织中 CAT 活力的计算：

(1)、定义：每毫克组织蛋白每秒钟分解 1 μ mol 的 H₂O₂ 的量为一个活力单位。

(2)、计算公式：

$$\text{组织匀浆中CAT活力 (U/mgprot)} = (\text{对照OD值} - \text{测定OD值}) \times 271^* \times \frac{1}{60 \times \text{取样量}} \div \frac{\text{待测样本蛋白浓度 (mgprot/ml)}}{1}$$

注：* 271 为斜率的倒数

(3)、计算举例：

例 1：取 0.5% 大鼠肝组织匀浆 0.05ml 作 CAT 检测，测得对照管吸光度为 0.671，测定管吸光度为 0.445，同时测得 0.5% 肝组织匀浆蛋白浓度为 0.48mgprot/ml。则计算结果为：

$$\text{组织匀浆中CAT活力 (U/mgprot)} = (0.671 - 0.445) \times 271 \times \frac{1}{60 \times 0.05} \div 0.48 = 42.53 \text{ U/mgprot}$$

例 2：取 5% 蚯蚓组织匀浆 0.05ml 作 CAT 检测，测得对照管吸光度为 0.605，测定管吸光度为 0.425，同时测得 5% 蚯蚓组织匀浆蛋白浓度为 3.1158mgprot/ml。则计算结果为：

$$\text{组织匀浆中CAT活力 (U/mgprot)} = (0.605 - 0.425) \times 271 \times \frac{1}{60 \times 0.05} \div 3.1158 = 5.2185 \text{ U/mgprot}$$

例 3：取 10% 水稻叶片匀浆 0.05ml 作 CAT 检测，测得对照管吸光度为 0.704，测定管吸光度为 0.332，同时测得 10% 水稻叶片匀浆蛋白浓度为 3.1303mgprot/ml。则计算结果为：

$$\text{组织匀浆中CAT活力 (U/mgprot)} = (0.704 - 0.332) \times 271 \times \frac{1}{60 \times 0.05} \div 3.1303 = 10.7351 \text{ U/mgprot}$$

例 4：取 0.5% 中华鲟肝组织匀浆 0.05ml 作 CAT 检测，测得对照管吸光度为 0.580，测定管吸光度为 0.426，同时测得 0.5% 中华鲟肝组织匀浆蛋白浓度为 0.3063mgprot/ml。则计算结果为：

$$\text{组织匀浆中CAT活力 (U/mgprot)} = (0.580 - 0.426) \times 271 \times \frac{1}{60 \times 0.05} \div 0.3063 = 22.7087 \text{ U/mgprot}$$

注意：

1、测定血清和血浆时，如果样本不溶血，每批样本只需要随机挑 2 个样本做对照或者用双蒸水代替样本做对照；如果样本溶血的话，必须每个样本都要做对照。

2、测定组织匀浆时，如果样本不是高脂，每批样本只需要随机挑 2 个样本做对照或者用双蒸水代替样本做对照；如果样本高脂，必须每个样本都要做对照。

3、测定全血时，必须每个样本都要做对照。

4、此试剂盒可用酶标仪读数，即在反应完后取 200ul 进 96 孔板 405nm 读数，计算公式中斜率倒数变更为 235.65 代入计算即可。



附录 I：最佳取样浓度摸索

一、样本来源：正常小鼠肝组织

二、前处理：

10%匀浆液的制备：准确称取组织重量，按重量 (g) :体积 (ml) =1:9 的比例，加入 9 倍体积的生理盐水，冰水浴条件下机械匀浆，制成 10%的组织匀浆，2500 转/分，离心 10 分钟，取上清液待测；

10%的匀浆液再用生理盐水稀释成不同的浓度：5%、2%、1%、0.5%、0.25%、0.125%

三、操作表：

	对照管	测定管
组织匀浆 (ml)		0.05
试剂一 (37°C 预温) (ml)	1.0	1.0
试剂二 (37°C 预温) (ml)	0.1	0.1
混匀，37°C 准确反应 1 分钟 (60 秒)		
试剂三 (ml)	1.0	1.0
试剂四 (ml)	0.1	0.1
组织匀浆 (ml)	0.05	

混匀，波长 405nm，光径 0.5cm，双蒸水调零，测定各管吸光度值。

注：一般样本没有高脂等导致显著差异情况，对照管的样本更换成双蒸水，做 1~2 管对照即可。如需做样本自身对照，则试剂盒所测定样本数量减至 48 样。

四、检测结果：

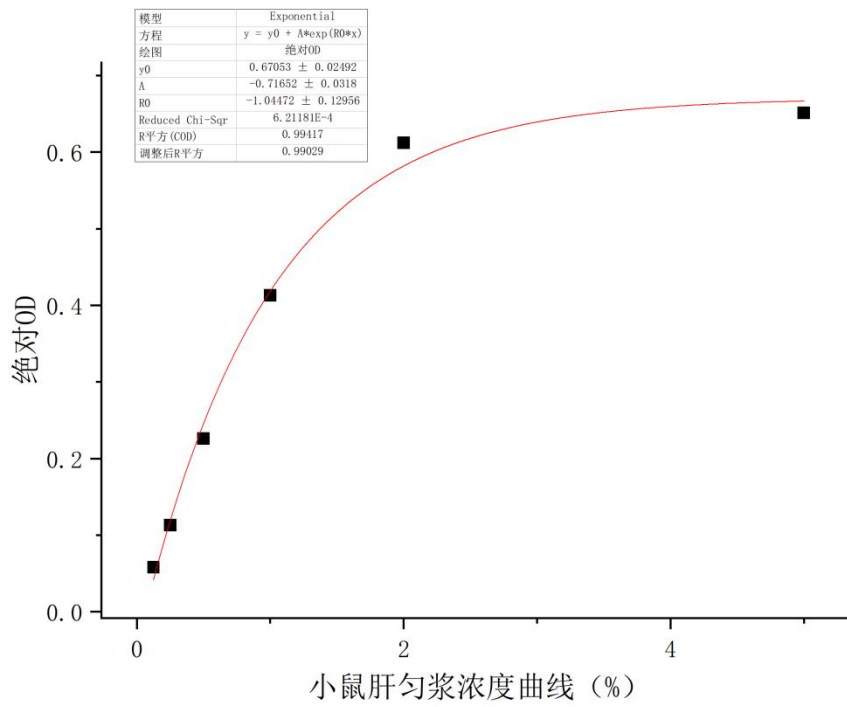
对照 OD 值	0.671					
匀浆液浓度	0.125%	0.25%	0.5%	1%	2%	5%
测定 OD	0.613	0.558	0.445	0.258	0.059	0.02
绝对 OD	0.058	0.113	0.226	0.413	0.612	0.651

五、小鼠组织最佳取样浓度的摸索曲线：

参考取样浓度：小鼠肝脏匀浆为 0.25%~1%。在其范围内酶曲线通过回归曲线的处理，相对成正比关系。若取样浓度过大或过少，则在实验结束后，在进行统计学处理时会出现无显著差异。



小鼠肝匀浆浓度曲线



本曲线采用 OriginPro 2021 软件绘制

模型	Exponential
方程	$y = y_0 + A \cdot \exp(R_0 \cdot x)$
绘图	绝对 OD
y0	0.67053 ± 0.02492
A	-0.71652 ± 0.0318
R0	-1.04472 ± 0.12956
Reduced Chi-Sqr	6.21181E-4
R平方(COD)	0.99417
调整后 R平方	0.99029

