

过氧化氢酶（CAT）测定试剂盒说明书

（货号：BC013-2 钼酸铵法 100管/96样）

一、测定原理：

过氧化氢酶（Catalase）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、试剂组成与配制：（100管/96 样）

试剂一：液体 100ml×1 瓶，4℃ 保存 6 个月。

试剂二：底物液体 10ml×1 瓶，4℃ 保存 6 个月。

试剂三：显色粉剂×1 瓶，4℃ 保存 6 个月。加双蒸水至 100ml 溶解，4℃ 保存 1 个月。（如果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℃ 保存 6 个月。天冷时会凝固，临用前 37℃ 水浴至透明方可使用

三、操作步骤：

（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℃ 预温）（ml）	1.0	1.0
试剂二（37℃ 预温）（ml）	0.1	0.1
混匀，37℃ 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
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，计算 $\Delta A = A_{\text{对照}} - A_{\text{测定}}$		

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；如每个样本都做样本自身对照，则试剂盒所测定样本数量减至 48 样。

[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℃ 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℃ 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。

2、血清中的 CAT 活力的计算

计算公式：

$$\text{血清（血浆）CAT 活力 (U/mL)} = \Delta A \times 271 \div V_{\text{样}} \div T \times N$$

注：271 为斜率的倒数，常数，直接使用

$V_{\text{样}}$ ：取样量，0.1mL

T：反应时间，60秒

N：样本测试前稀释倍数

计算举例：取 0.1mL 血清做 CAT 活力测定，测得对照管的吸光度为 0.720，测定管吸光度为 0.675，则计算结果为：

$$\text{血清（血浆）CAT 活力 (U/mL)} = (0.720 - 0.675) \times 271 \div 0.1 \div 60 \times 1 = 2.03 \text{U/mL}$$



(二)、全血的检测:

1、1:99 溶血液的制备: 取 50 μ l 全血加双蒸水至 5ml 充分混匀后放置 10 分钟, 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 $^{\circ}$ C 预温) (ml)	1.0	1.0	
试剂二 (37 $^{\circ}$ C 预温) (ml)	0.1	0.1	
混匀, 37 $^{\circ}$ 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, 计算 $\Delta A=A_{\text{对照}}-A_{\text{测定}}$			

注: 全血样本测定时, 每个样本都必须做自身对照管, 空白对照管只需做1管。

溶血液中 CAT 活力 (U/mgHb) = $\Delta A_{\text{溶血液}} \times 271 \div V_{\text{样}} \div T \div C_{\text{Hb}}$

C_{Hb} : 溶血液血红蛋白浓度,Mg/mL,需用血红蛋白测定试剂盒。

(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)。

3、操作表:

	对照管	测定管
组织匀浆 (ml)		0.05
试剂一 (37 $^{\circ}$ C 预温) (ml)	1.0	1.0
试剂二 (37 $^{\circ}$ C 预温) (ml)	0.1	0.1
混匀, 37 $^{\circ}$ 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
血清 (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, 计算 $\Delta A=A_{\text{对照}}-A_{\text{测定}}$		

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。

组织中 CAT 活力 (U/mgHb) = $\Delta A \times 271 \div V_{\text{样}} \div T \div C_{\text{pr}}$

C_{pr} : 组织匀浆液蛋白浓度,mgprot/mL,需用蛋白定量试剂盒 (BC016)。

- 注: 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、本试剂盒亦可用酶标仪读数 (即在反应完后取 200 μ l 进孔板 405nm 读数, 计算公式斜率倒数变为 235.65 代入计算)。

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：

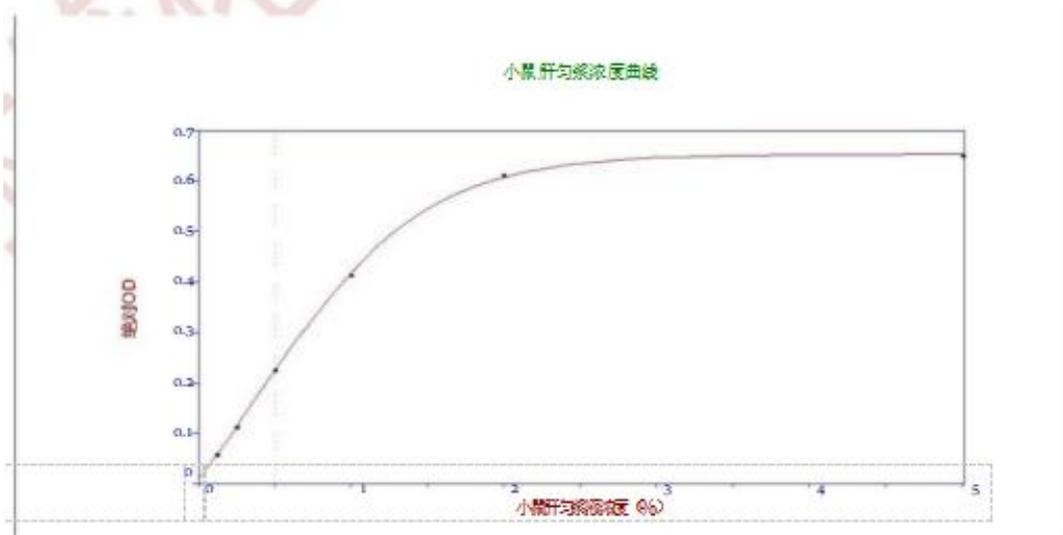
	对照管	测定管
组织匀浆（ml）		0.05
试剂一（37℃预温）（ml）	1.0	1.0
试剂二（37℃预温）（ml）	0.1	0.1
混匀，37℃准确反应 1 分钟（60 秒）		
试剂三（ml）	1.0	1.0
试剂四（ml）	0.1	0.1
血清（浆）（ml）	0.05	
混匀，波长 405nm，光径 0.5cm，双蒸水调零，测定各管吸光度值，计算 $\Delta A = A_{\text{对照}} - A_{\text{测定}}$		

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。



Address: No. 388, Gaoxin 2nd Road, East Lake Hi-tech Development Zone, Wuhan, China

