



中科瑞泰（北京）生物科技有限公司
Tel: 400-699-0631
http:// www.real-times.com.cn
E-mail: real-times@vip.163.com

植物过氧化氢酶 CAT 检测试剂盒（钼酸铵微板法）

Plant Catalase Assay Kit (Ammonium molybdate, Spectrometer Method)

Ver.751173-1.0

货号	名称	规格
CT1060M	植物过氧化氢酶检测试剂盒（钼酸铵微板法）	100 次

● 产品组成:

组分货号	名称	规格	贮存
CT1060M-01	提取液	100 ml	4°C
CT1060M-02	检测缓冲液	30 ml	4°C
CT1060M-03	显色底物（粉末型）	30 ml	4°C, 避光
CT1060M-04	过氧化氢（约 1 M）	1 ml	4°C, 避光
	说明书	一份	

● 产品简介:

植物过氧化氢酶检测试剂盒 (Plant Catalase Assay Kit)是一种简单易行的通过显色反应来检测植物体内过氧化氢酶(Catalase, CAT)活性的试剂盒。测定原理简述如下：样品中的过氧化氢酶（CAT）在过氧化氢相对比较充足的情况下，可以催化过氧化氢产生水和氧气（酶促反应），反应式为： $2H_2O_2 \rightarrow 2H_2O + O_2$ ；酶促反应后残余的过氧化氢与钼酸铵产生具有吸收波长为 405 nm 的黄色产物（显色反应），平行对照反应中含有已知浓度的初始过氧化氢浓度，通过计算对照反应与样本反应 A405 读数的差值，确定酶促反应中有多少过氧化氢被 CAT 催化分解，根据计算公式计算出样品中 CAT 活性。

本试剂盒的 CAT 活性测定特点是从紫外波长（240 nm）转换到可见波长（405 nm）检测，无需使用紫外比色皿或 UV 微孔板。同时也避免了使用 UV 测定法中蛋白质在 A240 吸收对测定结果的严重干扰。

本试剂盒用于检测植物样品中的过氧化氢酶的活性，不推荐用于动物以及体液样品 CAT 活性的检测。

使用酶标仪检测，以每次提取使用 1 ml 提取液，测试体系每次 0.3 ml 计算，该试剂盒可以进行约 100 次检测。

● 贮存、运输及效期:

4°C 贮存；常温运输；有效期 6 个月。

● 自备材料:

植物材料；研钵；石英砂；聚乙烯吡咯烷酮（PVPP）；1 ml 石英比色皿（光程 1 cm）（校正过氧化氢浓度用）；酶标仪（检测波长 405 nm）；低温台式离心机；可调式移液器；冰；蒸馏水。

● 实验准备:

1. 酶标仪预热 30 min, 设定波长到 405 nm。
2. 取出试剂盒组份, 常温放置 30 分钟, 平衡温度至常温。
3. 提前打开制冰机。

● 操作步骤:

一. 试剂盒的准备工作:

1.1 测定过氧化氢溶液精确浓度:

本试剂盒提供的过氧化氢浓度约为 1 M。由于过氧化氢不是很稳定, 使用前需自行测定过氧化氢的实际浓度。方法如下: 首先把浓度约为 1 M 的过氧化氢用蒸馏水稀释 100 倍, 使过氧化氢的浓度约为 10 mM。随后用如下方法之一测定 A240:

1.1.1 普通紫外分光光度计法:

使用紫外分光光度计, 使用 1 ml 石英比色皿 (光程 1 cm), 用蒸馏水作为对照, 测定 A240。

注: 用比色皿检测的过氧化氢浓度最接近实际浓度。

1.1.2 96 孔紫外酶标仪法(必须能检测 240 nm 波长):

根据 96 孔板的参数确定光程, 一般 200 微升样品的光程为 0.552 cm (样品体积除以 96 孔单孔孔内横截面面积)。一般建议使用专用的 96 孔紫外检测板(如 96 孔 UV 板), 如果没有紫外检测板, 也可使用一般的 96 孔板, 但由于不是紫外检测专用板, 会有非常高的紫外吸收信号, 所以需要设置含等量蒸馏水的孔作为空白对照(一般 200 μ l 水在该类 96 孔板的 A240 在 3.8 左右), 计算时须减去该空白对照。在使用非紫外检测专用板的情况下, 由于 96 孔酶标仪在 240 nm 的检测上限有限, 建议将过氧化氢稀释至约 10 mM 左右后再进行浓度测定。

注意: 以上所有方法都需要设置等量蒸馏水作为空白对照, 并在计算时减去该空白对照。

1.1.3 过氧化氢精准浓度计算:

计算公式: $c=A/(\epsilon \times b)$ 。其中: c 为样品浓度(单位为 mol/L 或 M); A 为吸光值; ϵ 为波长依赖的摩尔消光系数(单位为 $L \times \text{mol}^{-1} \times \text{cm}^{-1}$ 或 $M^{-1} \times \text{cm}^{-1}$), 过氧化氢的摩尔消光系数为 $43.6 M^{-1} \text{cm}^{-1}$; b = 光程(单位为 cm)。过氧化氢浓度(M)=A240/(43.6 \times b); 即: 过氧化氢浓度(mM)=22.94 \times A240/b。

示例 1-微孔板测定浓度:

将本试剂盒提供的约为 1 M 的过氧化氢用蒸馏水稀释 100 倍后, 用 96 孔酶标仪, 使用普通 96 孔板进行检测, 每孔 200 微升, 每组 3 个平行。蒸馏水对照组的平均 A240 为 3.750, 过氧化氢样品组的平均 A240 为 3.974, 差值为 0.224, 200 微升样品的光程为 0.552 cm, 代入公式, 过氧化氢浓度(mM)=22.94 \times 0.224/0.552=9.31 mM, 则实际本试剂盒提供的过氧化氢浓度为 0.931 M。

示例 2-石英比色皿测定浓度:

取蒸馏水 1980 μ l, 加入本试剂盒提供的约为 1 M 的过氧化氢 20 μ l (稀释 100 倍) 混匀, 取 1ml 混合液加入到 1 ml 石英比色皿中 (光程 1 cm), 用 1 ml 蒸馏水作为对照, 用紫外分光光度计测定混合液的 A240=0.435, 代入公式, 过氧化氢浓度(mM)=22.94 \times 0.435/1=9.98 mM, 则实际本试剂盒提供的过氧化氢浓度为 0.998 M。

1.2 配制 20 μ mol/ml (20 mM) 过氧化氢溶液:

根据测定得到的实际过氧化氢浓度用**检测缓冲液**配制成 20 μ mol/ml (20 mM) 过氧化氢溶液, 该溶液建议使用**棕色管**配制, 现用现配, **4 $^{\circ}$ C 避光可以贮存 3 天。**

注：进行一次样品测定，可以配制 1 ml 20 mM 过氧化氢溶液。

1.3 配制显色底物：

显色底物提供的是粉末包装，取一瓶粉末装显色底物，加入 30 ml 蒸馏水，彻底混匀至粉末完全溶解；显色底物溶液配制后 4℃ 避光贮存。

二. 样本处理：

1.1 取新鲜植物组织，按照组织质量 (g)：提取液体积 (ml) 为~1：10 的比例进行冰浴匀浆，制成 10% 匀浆液，如 0.1 g 组织，加入 1 ml 提取液，进行冰浴匀浆；

注：水分充足的样品可以制成 5% 匀浆液 (0.5 g：10 ml)；对于纤维含量多的植物如水稻叶片，可加入适量石英砂 (试剂盒不提供，自备) 辅助研磨，提高研磨效率；对于多糖多酚含量高的植物，可以在提取液中加入 1% PVPP (试剂盒不提供，自备)，能有效去除多糖多酚对活性测定的干扰。

1.2 12000 rpm，4℃ 离心 10 min，取上清，即为含有 CAT 的样本，置冰上待测。

注：**提取的样本如需贮存，4℃ 贮存 3 天；建议按需分装后-80℃ 贮存，两周内使用，尽量避免反复冻融；**不建议-20℃ 贮存。

三. 样品测定：

3.1 表一 样品测定流程表 (0.3 ml 测定体系)：

在 1.5 ml 离心管中配制如下反应：

		反应 1	反应 2	反应 3	反应 4
		空白管	标准管	样本对照管	样本测定管
酶促反应	20 mM 过氧化氢溶液	0 μl	90 μl	0 μl	90 μl
	检测缓冲液	120 μl	30 μl	120-x μl	30-x μl
	样本体积	0 μl	0 μl	x μl	x μl
	25℃ 反应 10 min (加入样本后立即准确计时)				
注 1：原理-样品中的 CAT 分解过氧化氢底物，反应 4 中会有气泡产生，气泡越多说明样本中 CAT 活性越强；					
注 2：不同植物材料，CAT 活性差异很大，10% 匀浆液 x 经验值一般为 3-10；					
显色反应	立即向酶促反应中加入 180 μl 显色底物；				
	25℃ 孵育 10 min 后读数 A405；				
	注 1：原理-样品中过氧化氢与显色底物反应；				
注 2：反应 2-标准管中黄色颜色最深，A405 ~0.8 左右；反应 4-样本反应的颜色应该浅于标准管，A405 ~0.3，如果反应 4 颜色很浅甚至无色，说明酶促反应中样本酶活性太高，需要降低样本体积 x 的加入量。如果样本反应管中黄色很深，几乎与标准管颜色无区别，说明样本中酶活性很低，需要加大样本体积 x 的加入量或者需要重新制备 CAT 活性高的样本。					
注 3：显色示例					
					

3.2 酶促反应:

参考表一, 在 1.5 ml 离心管中, 加入溶液, 用移液器迅速混匀; 25°C 精确计时反应 10 分钟。

3.3 显色反应:

立即向酶促反应管中加入 180 μl 显色底物, 混匀。

3.4 读数:

取 200 μl 溶液加到微孔板中, 25°C 孵育 10 分钟后测定样品 A405。

四. 活性计算:

4.1 按照分解过氧化氢微摩尔数计算:

单位定义: 在 25°C pH7.0 的条件下, 在 1 分钟内可以催化分解 1 微摩尔过氧化氢为 1 个酶活力单位 (U/ml)。

计算公式: CAT 活性 (U/ml) =

$$\frac{\Delta A}{\Delta \text{标准}} \times \frac{1}{T} \times [\text{过氧化氢浓度}] \times V_{\text{标准}} \times \frac{\text{显色反应总体积}}{V_{\text{样}}} \times D \times 1.5 = \frac{\Delta A}{\Delta \text{标准}} \times \frac{0.081}{V_{\text{样}}}$$

注解:

Δ标准=A 标准-A 空白; Δ测定=A 测定-A 对照; ΔA=Δ标准-Δ测定

T (min): 10, CAT 酶促反应的实际时间为 10 min

过氧化氢浓度 (μmol/ml): 20, 酶促反应中使用的过氧化氢浓度为 20 mM (μmol/ml)

V 标准 (ml): 0.09, 酶促反应中加入过氧化氢体积数为 90 μl

显色反应总体积 (ml): 0.3, 显色反应总体积为 0.3 ml

V 样 (ml): 酶促反应中加入的样本体积 x μl, 转换为 ml 数

D= 样本稀释倍数, 未稀释为 1

1.5: 300 μl 反应体系中取 200 μl 读数

计算示例-绿萝 CAT 活性测定-按照分解过氧化氢微摩尔数计算:

取 0.5 克绿萝叶片, 加入 5 ml 提取液冰浴匀浆, 制成 10% 匀浆液, 12000 rpm 4°C 离心 10 min, 取上清置于冰上, 按照测定步骤操作, 取 x=6 μl 样本测试, 25°C CAT 酶促反应 10 min (T=10), 加 180 μl 显色工作液, 常温 10 min, 使用酶标仪检测波长 405 nm, 读数: A 标准=0.475, A 空白=0.1, A 对照=0.138, A 测定=0.193, Δ标准=A 标准-A 空白=0.475-0.1=0.375, Δ测定=A 测定-A 对照=0.193-0.138=0.055, ΔA=Δ标准-Δ测定=0.375-0.055=0.32, CAT 活性 (U/ml)=0.32/0.375*0.081/0.006=11.5

4.2 按照样本鲜重 (FW) 计算:

单位定义: 在 25°C pH7.0 的条件下, 每 g 植物组织每分钟内可以催化分解 1 微摩尔过氧化氢为 1 个酶活力单位 (U/g FW)。

计算公式: CAT 活性 (U/g FW) =

$$\frac{\Delta A}{\Delta \text{标准}} \times \frac{1}{T} \times [\text{过氧化氢浓度}] \times V_{\text{标准}} \times \frac{V_{\text{样总}}}{V_{\text{样}}} \times \frac{1}{W} \times D \times 1.5 = \frac{\Delta A}{\Delta \text{标准}} \times \frac{V_{\text{样总}}}{V_{\text{样}}} \times \frac{0.27}{W}$$

注解:

Δ标准=A 标准-A 空白; Δ测定=A 测定-A 对照; ΔA=Δ标准-Δ测定

T (min): 10, CAT 酶促反应的实际时间为 10 min

过氧化氢浓度 (μmol/ml): 20, 酶促反应中使用的过氧化氢浓度为 20 mM (μmol/ml)

V 标准 (ml): 0.09, 酶促反应中加入过氧化氢体积数为 90 μl

显色反应总体积 (ml): 0.3, 显色反应总体积为 0.3 ml

V 样总 (ml): 加入提取液总体积

V 样 (ml)：酶促反应中加入的样本体积 x μ l，转换为 ml 数

W (g)：组织鲜重

D= 样本稀释倍数，未稀释为 1

1.5: 300 μ l 反应体系中取 200 μ l 读数

计算示例-绿萝 CAT 活性测定-按照样本鲜重 (FW) 计算：

取 0.5 克绿萝叶片，加入 5 ml 提取液冰浴匀浆，制成 10% 匀浆液，12000 rpm 4°C 离心 10 min，取上清置于冰上，按照测定步骤操作，取 x=6 μ l 样本测试，25°C CAT 酶促反应 10 min (T=10)，加 180 μ l 显色工作液，常温 10 min，使用酶标仪检测波长 405 nm，读数：A 标准=0.475，A 空白=0.1，A 对照=0.138，A 测定=0.193， Δ 标准=A 标准-A 空白=0.475-0.1=0.375， Δ 测定=A 测定-A 对照=0.193-0.138=0.055， Δ A= Δ 标准- Δ 测定=0.375-0.055=0.32，CAT 活性 (U/g FW) =0.32/0.375*5/0.006 \times 0.27/0.5=383.8