



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（钼酸铵分光法）

Plant Catalase Assay Kit (Ammonium molybdate, Spectrometer Method)

Ver.751252-3.0

货号	名称	规格
CT1060F	植物过氧化氢酶检测试剂盒（钼酸铵分光法）	100 次

● 产品组成:

组分货号	名称	规格	贮存
CT1060F-01	提取缓冲液	100 ml	4℃
CT1060F-02	检测缓冲液	60 ml	4℃
CT1060F-03	显色底物（粉末型）	60 ml	4℃，避光
CT1060F-04	过氧化氢（约 1 M）	2×1 ml	4℃，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。

以使用 1 ml 显色反应体系计算，该试剂盒共可以进行 100 次检测。

● 贮存、运输及效期:

4℃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）；1 ml 玻璃比色皿（光程 1 cm）；紫外可见分光光度计（检测波长 240 nm 和 405 nm）；低温台式离心机；可调式移液器；冰；蒸馏水。

● 实验准备:

1. 分光光度计预热 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 $\text{M}^{-1} \times \text{cm}^{-1}$)，过氧化氢的摩尔消光系数为 $43.6 \text{ M}^{-1}\text{cm}^{-1}$ ； b = 光程(单位为 cm)。过氧化氢浓度(M)= $A_{240}/(43.6 \times b)$ ；即：过氧化氢浓度(mM)= $22.94 \times A_{240}/b$ 。

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)= $22.94 \times 0.224/0.552=9.31 \text{ mM}$ ，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)= $22.94 \times 0.435/1=9.98 \text{ mM}$ ，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 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℃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。

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（1 ml 测定体系）：

		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	300 μl	0 μl	300 μl
	检测缓冲液	400 μl	100 μl	400-x μl	100-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 10-30；				
显色反应	立即向酶促反应中加入 600 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 ~1.7 左右；反应 4-样本反应的颜色应该浅于标准管，A405 ~1.2，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℃ 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 600 μl 显色底物，混匀。

3.4 读数:

25℃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℃ 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) =

$$\frac{\Delta A}{\Delta \text{标准}} \times \frac{1}{T} \times [\text{过氧化氢浓度}] \times V_{\text{标准}} \times \frac{\text{显色反应总体积}}{V_{\text{样}}} \times D = \frac{\Delta A}{\Delta \text{标准}} \times \frac{0.6}{x}$$

注解:

$\Delta \text{标准} = A_{\text{标准}} - A_{\text{空白}}$; $\Delta \text{测定} = A_{\text{测定}} - A_{\text{对照}}$; $\Delta A = \Delta \text{标准} - \Delta \text{测定}$

T (min): 10, CAT 酶促反应的实际时间为 10 min

过氧化氢浓度 ($\mu\text{mol/ml}$): 20, 酶促反应中使用的过氧化氢浓度为 20 mM ($\mu\text{mol/ml}$)

V 标准 (ml): 0.3, 酶促反应中加入过氧化氢体积数为 300 μl

显色反应总体积 (ml): 1, 显色反应总体积为 1 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

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℃ 离心 10 min, 取上清置于冰上, 按照测定步骤操作, 取 x=20 μl 样本测试, 25℃ CAT 酶促反应 10 min (T=10), 加 600 μl 显色工作液, 常温 10 min, 使用 1 ml 石英比色皿 (光径 1 cm), 设定分光光度计检测波长 405 nm, 读数: A 标准=1.798, A 空白=1.030, A 对照=1.111, A 测定=1.200, $\Delta \text{标准} = A_{\text{标准}} - A_{\text{空白}} = 1.798 - 1.030 = 0.768$, $\Delta \text{测定} = A_{\text{测定}} - A_{\text{对照}} = 1.200 - 1.111 = 0.089$, $\Delta A = \Delta \text{标准} - \Delta \text{测定} = 0.768 - 0.089 = 0.679$, CAT 活性 (U/ml) = $0.679 / 0.768 \times 0.6 / 0.02 = 26.5$

4.2 按照样本鲜重 (FW) 计算:

单位定义: 在 25℃ 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) =

$$\frac{\Delta A}{\Delta \text{标准}} \times \frac{1}{T} \times [\text{过氧化氢浓度}] \times V_{\text{标准}} \times \frac{V_{\text{样总}}}{V_{\text{样}}} \times \frac{1}{W} \times D = \frac{\Delta A}{\Delta \text{标准}} \times \frac{V_{\text{样总}}}{V_{\text{样}}} \times \frac{0.6}{W}$$

注解:

$\Delta \text{标准} = A_{\text{标准}} - A_{\text{空白}}$; $\Delta \text{测定} = A_{\text{测定}} - A_{\text{对照}}$; $\Delta A = \Delta \text{标准} - \Delta \text{测定}$

T (min): 10, CAT 酶促反应的实际时间为 10 min

过氧化氢浓度 ($\mu\text{mol/ml}$): 20, 酶促反应中使用的过氧化氢浓度为 20 mM ($\mu\text{mol/ml}$)

V 标准 (ml): 0.3, 酶促反应中加入过氧化氢体积数为 300 μl

显色反应总体积 (ml): 1, 显色反应总体积为 1 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 μl , 转换为 ml 数

W (g): 组织鲜重

D = 样本稀释倍数, 未稀释为 1

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℃ 离心 10 min, 取上清置于冰上, 按照测定步骤操作, 取 x=20 μl 样本测试, 25℃ CAT 酶促反应 10 min (T=10), 加 600 μl 显色工作液, 常温 10 min, 使用 1 ml 石英比色皿 (光径 1 cm), 设定分

光光度计检测波长 405 nm, 读数: A 标准=1.798, A 空白=1.030, A 对照=1.111, A 测定=1.200,
 Δ 标准=A 标准-A 空白=1.798-1.030=0.768, Δ 测定=A 测定-A 对照=1.200-1.111=0.089, Δ A=
 Δ 标准- Δ 测定=0.768-0.089=0.679, CAT 活性 (U/ml) =0.679/0.768*5/0.02 $\times$ 0.6/0.5=265