

CheKine™ Pro 过氧化氢酶 (CAT) 活性检测试剂盒 (荧光法)

货号: KTB9040

规格: 48 T/24 S

96 T/48 S

批号: 见产品标签

	检测范围: 0.01-10 U/mL		灵敏度: 0.01 U/mL
	适用样本: 动物或植物组织、细胞、血清 (浆) 或其他液体		
	保质期: -20°C, 避光保存 6 个月		

01 背景与原理

过氧化氢酶 (Catalase, CAT) (EC 1.11.1.6) 是生物体内关键的抗氧化酶, 能高效催化过氧化氢 (H_2O_2) 分解为无害的水和氧气, 从而保护细胞免受 H_2O_2 引起的氧化损伤。CAT 的活性是衡量机体抗氧化能力的重要指标, 与细胞的健康、衰老及多种病理过程紧密相关。

本试剂盒检测原理是 CAT 分解 H_2O_2 产生水和氧气, 未分解的 H_2O_2 在特定酶和荧光探针作用下生成荧光产物。该产物在激发波长 535 nm、发射波长 587 nm 处的荧光强度与残留的 H_2O_2 浓度成正比, 通过检测此荧光信号即可估算出 CAT 的活性。

02 包装清单

试剂盒组分	规格		储存要求
	48 T	96 T	
Assay Buffer	60 mL	60 mL×2	4°C
Reagent I	50 µL	100 µL	-20°C, 避光保存
Reagent II	25 µL	50 µL	-20°C, 避光保存
Reagent III	25 µL	50 µL	-20°C, 避光保存
Standard (1 M)	0.4 mL	0.4 mL	-20°C, 避光保存

*请在实验前检查各组分的量。

*各组分在规格基础上额外提供 10% 的量用于进行标准曲线制作或预实验。

03 自备仪器与试剂

自备资源类型	资源名称	备注
仪器	荧光酶标仪	激发波长为 535 nm，发射波长为 587 nm
耗材	96 孔酶标板	全黑板
试剂	去离子水/PBS	试剂稀释用/样本清洗用
其他	匀浆器（组织样本）、低温离心机、水浴锅、制冰机、 可调节式移液枪及枪头	检测量较大时合理使用多通道移液器有 助于提高实验效率

04 注意事项

- 正式检测前，建议选择 2-3 个预期差异较大的样本进行预实验。
- 对于组织样本及细胞样本等，可通过测定蛋白浓度来进行样本间结果均一化。推荐使用亚科因货号：KTD3001 的蛋白质定量试剂盒（BCA 法）。
- 建议实验者自行建立标准曲线以提高结果准确度。如未自行建立标准曲线，可参考结果展示部分的典型标准曲线公式进行结果计算。
- 生化检测试剂普遍具有刺激性、生物毒性等，为了您的安全和健康，请在实验全程做好生物安全防护，穿戴实验服、口罩、手套、头套等安全护具，在通风橱、生物安全柜中进行实验。
- 本产品仅供科学研究使用，不适用于临床诊断。

05 实验流程

05-1 试剂准备

05-1-1 试剂准备

试剂名称	试剂准备	注意事项
Assay Buffer	即用型	4℃保存
Reagent I	即用型；使用前，平衡到室温	用不完的试剂在-20℃避光分装保存，避免反复冻融； Reagent I 有毒，建议在通风橱进行实验
Reagent II	即用型	-20℃避光保存
H ₂ O ₂ Reagent III	临用前配制；取 5 μL Reagent III加入 4.995 mL 去离子水，混匀，取 15 μL 稀释后的 Reagent III，加入 4.395 mL Assay Buffer，混匀，现用现配，按需配制，当天内使用；	Reagent III有腐蚀性，建议在通风橱进行实验
Working Reagent	临用前避光配制；取 50 μL Reagent I 和 20 μL Reagent II，加入 4.93 mL Assay Buffer，充分混匀，该体积可用 100 次，按需配制，当天内使用，	使用时须避光
Standard (1 M)	即用型	实验过程中避光冰上放置；未用完的试剂分装后-20℃避光保存，禁止反复冻融

05-1-2 标准品配制

使用前，根据用量将 Standard (1 M)用去离子水稀释 10000 倍得到 0.1 mM 标准品，充分混匀待用。使用 0.1 mM 标准品，按下表所示，进行下一步稀释。每次实验都要做一次标准品检测，制作标曲；稀释后的标准品溶液不稳定，必须在 4 小时内使用。

序号	0.1 mM 标准品体积 (μL)	去离子水体积 (μL)	标准品浓度 (μM)
1	100	100	50
2	80	120	40
3	40	160	20
4	20	180	10
5	10	190	5
6	5	195	2.5
7	2.5	197.5	1.25
空白孔	0	200	0

05-2 样本制备

注意：推荐使用新鲜样本，如果不立即进行实验，应储存在-80℃保存。测定时，应控制解冻的温度和时间。室温环境下解冻时，需在 4 h 内完成样品解冻。

- 动植物组织：称取 0.1 g 样本，加入 1 mL 冷的 Assay Buffer，冰浴匀浆，10000 g，4℃离心 10 min，取上清液，置冰上待测。
- 细胞：收集 5×10^6 个细胞到离心管内，用预冷的 PBS 清洗细胞，800 g 离心 2 min，弃上清。加入 1 mL 冷的 Assay Buffer，冰浴超声波破碎 5 min（功率 20%或 200 W，超声 3 s，间隔 7 s，重复 30 次），10000 g，4℃离心 10 min，取上清液，置冰上待测。
- 血清（浆）等液体样本：10000 g，4℃离心 10 min，取上清液，置冰上待测。

注意：实验之前建议选择 2-3 个预期差异大的样本用 Assay Buffer 稀释成不同浓度进行预实验，根据预试验的结果，结合本试剂盒的线性范围：0.01-10 U/mL，请参考下表稀释（仅供参考）。

样本	稀释倍数	样本	稀释倍数
10 %小鼠脑	30-60	10 %小鼠肺	150-300
胎牛血清	2-10	293 cells	4-10
人唾液	30-60	L929 细胞上清	不稀释
人尿液	30-50	10 %烟草叶	2-6

05-3 实验步骤

- 1. 酶标仪准备：荧光酶标仪预热到 37℃，调节激发波长为 535 nm，发射波长为 587 nm。
- 2. 检测体系配制：下述操作在全黑 96 孔板中操作：

试剂	测定孔 (μL)	对照孔 (μL)	标准孔 (μL)
样本	25	0	0
标准品	0	0	25
去离子水	0	0	25
H ₂ O ₂ Reagent III	25	25	0
酶标仪上振板 10 s，37℃反应 5 min			
Working Reagent	50	50	50
样本	0	25	0

- 3. 吸光度检测：混匀，室温避光静置 10 min，荧光酶标仪上设置激发波长 535 nm，发射波长 587 nm，测定各孔荧光值，分别记为 RFU_{测定}、RFU_{对照}、RFU_{标准}和 RFU_{空白}。

06 结果计算

06-1 自动计算

为帮助您更轻松、准确地完成相关计算，我们特在官网提供了“在线计算器小工具”。您无需手动计算，只需在网页上输入数值，即可快速获得可靠结果。访问方式：请扫描右侧二维码或访问官网[\[https://www.abbkine.cn\]](https://www.abbkine.cn) > 进入“技术中心”> 查找“在线计算器”工具。

06-2 手动计算

以下为您提供的推导过程计算公式和简洁计算公式，两者完全相等。

1. 数据处理

计算 $\Delta RFU_{测定} = RFU_{对照} - RFU_{测定}$ ， $\Delta RFU_{标准} = RFU_{标准} - RFU_{空白}$

2. 标准曲线绘制

以标准品浓度为 y 轴， $\Delta RFU_{标准}$ 为 x 轴，绘制标准曲线，得到标准方程，将 $\Delta RFU_{测定}$ 带入方程得到 y (μM)。

3. CAT 活性的计算

- 按样本蛋白浓度计算：

酶活单位定义：37℃条件下，每 mg 蛋白每分钟分解 1 nmol H₂O₂ 的量为一个活力单位。

$CAT(U/mg\ prot) = y \times n \div 5 \div Cpr$

- 按样本鲜重计算：

酶活单位定义：37℃条件下，每 g 组织每分钟分解 1 nmol H₂O₂ 的量为一个活力单位。

$CAT(U/g) = y \times n \div 5 \div W$

- 按细胞数量计算：

酶活单位定义：37℃条件下，每 10⁴ 个细胞每分钟分解 1 nmol H₂O₂ 的量为一个活力单位。

$CAT(U/10^4\ cell) = y \times n \div 5 \div N$

- 按样本体积计算：

酶活单位定义：37℃条件下，每 mL 液体每分钟分解 1 nmol H₂O₂ 的量为一个活力单位。

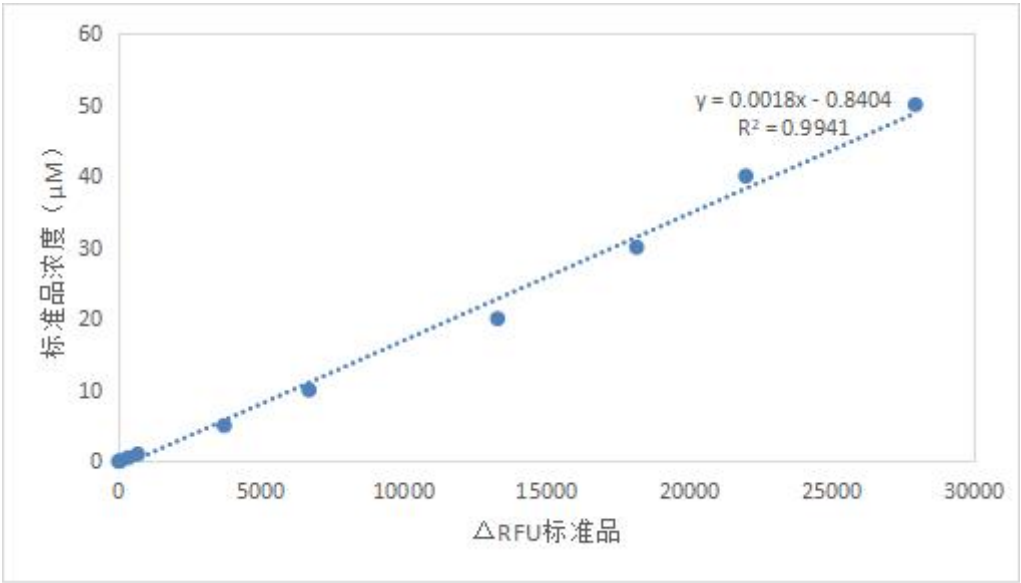
$CAT(U/mL) = y \times n \div 5$



Cpr: 样本蛋白质浓度, mg/mL; 5: 反应时间, 5 min; n: 样本稀释倍数; W: 样品质量, g; N: 细胞数量, 以 10⁴ 为单位 (例如细胞数量为 5×10⁶, N=500)。

07 结果展示

典型标准曲线: $y=0.0018x-0.8404$, $R^2=0.9941$



示例-1: 取人尿液离心取上清稀释 50 倍之后按照测定步骤操作, 用全黑 96 孔板测得: RFU_{测定} 为 12716, RFU_{对照} 为 17521, $\Delta\text{RFU}_{\text{测定}} = \text{RFU}_{\text{对照}} - \text{RFU}_{\text{测定}} = 17521 - 12716 = 4805$, 代入标准曲线, 计算 $y=0.0018x-0.8404$, H₂O₂ 浓度为 7.81 μM, 50 倍稀释的人尿液 CAT(U/mL)=7.81×50÷5=78.1 U/mL。

08 相关产品

货号	试剂盒名称
KTB9050	CheKine™ Pro 丙二醛 (MDA) 含量检测试剂盒 (荧光法)
KTB9300	CheKine™ Pro 葡萄糖含量检测试剂盒 (荧光法)
KTB9041	CheKine™ Pro 过氧化氢 (H ₂ O ₂) 含量检测试剂盒 (荧光法)

CheKine™ Pro 过氧化氢酶（CAT）活性检测流程示意图

(Abbkin 货号：KTB9040)

