

## 过氧化氢酶 (Catalase, CAT) 试剂盒(钼酸铵比色法)说明书

微量法 100 管/48 样

### 测定意义:

CAT(EC 1.11.1.6)广泛存在于动物、植物、微生物和培养细胞中,是最主要的 H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> 清除酶,在活性氧清除系统中具有重要作用。

### 测定原理:

过氧化氢能氧化 MoO<sub>4</sub><sup>2-</sup>成 MoO<sub>5</sub><sup>2-</sup>,MoO<sub>5</sub><sup>2-</sup>接受氢氧根的电子成键,分子间立即脱水缩合,得到稳定的黄色复合物(H<sub>2</sub>MoO<sub>4</sub>·XH<sub>2</sub>O)<sub>n</sub> 在 405nm 处有强烈吸收峰,其吸光值和过氧化氢浓度成线性关系。测定出体系剩余过氧化氢在 405nm 的吸光值即可反映 CAT 的催化活性。

### 需自备的仪器和用品:

酶标仪、台式离心机、可调式移液器、96 孔板、研钵、冰和蒸馏水

### 试剂组成和配制:

提取液: 液体 100 mL×1 瓶, 4℃保存;

试剂一: 液体 5 mL×1 瓶, 4℃避光保存;

试剂二: 液体 15 mL×1 瓶, 常温保存; (过饱和试剂, 如有结晶析出, 可 37℃加热搅拌溶解) 试剂三: 液体 30 mL×1 瓶, 4℃保存; (过饱和试剂, 如有絮状沉淀, 可 37℃加热搅拌溶解)

### 粗酶液提取:

#### 1、细菌、细胞或组织样品的制备:

细菌或培养细胞: 先收集细菌或细胞到离心管内, 离心后弃上清; 按照细菌或细胞数量 (10<sup>4</sup> 个): 提取液体积 (mL) 为 500~1000: 1 的比例 (建议 500 万细菌或细胞加入 1mL 提取液), 超声波破碎细菌或细胞 (冰浴, 功率 20%或 200W, 超声 3s, 间隔 10s, 重复 30 次); 8000g 4℃离心 10min, 取上清, 置冰上待测。

组织: 按照组织质量 (g): 提取液体积(mL)为 1: 5~10 的比例 (建议称取约 0.1g 组织, 加入 1mL 提取液), 进行冰浴匀浆。8000g 4℃离心 10min, 取上清, 置冰上待测。

#### 2、血清 (浆) 样品: 直接检测。

### 测定步骤:

1、酶标仪预热 30min 以上, 调节波长至 405 nm。

2、在 EP 管中加入下列试剂

试剂名称 (μL)	测定管	试剂名称 (μL)	对照管
样本	50	试剂一	30
试剂一	30	试剂二	100
混匀, 25℃准确反应 10 min		试剂三	265
试剂二	100	混匀	
试剂三	265	样本	50
混匀, 取 200 μL 于 96 孔板立即测定 A 测定和 A 对照, A=A 对照-A 测定。每个测定管需设一个对照管。			

CAT 活性计算:

1、标准曲线:  $y = 0.1x + 0.0013$   $R^2 = 1$   $x$ : 体系中过氧化氢浓度变化值 ( $\mu\text{mol/mL}$ )  $y$ : 吸光值差值  $A$

2、血清(浆) CAT 活力的计算:

单位的定义: 每毫升血清(浆)每分钟催化  $1\ \mu\text{mol H}_2\text{O}_2$  降解定义为一个酶活力单位。

$\text{CAT}(\mu\text{mol/min/mL}) = (A - 0.0013) \div 0.1 \times V_{\text{反总}} \div V_{\text{样}} \div T$

$$= 8.9 \times (A - 0.0013)$$

3、组织、细菌或细胞中 CAT 活力计算:

(1) 按样本蛋白浓度计算:

单位的定义: 每  $\text{mg}$  组织蛋白每分钟催化  $1\ \mu\text{mol H}_2\text{O}_2$  降解定义为一个酶活力单位。

$\text{CAT}(\mu\text{mol/min/mg prot}) = (A - 0.0013) \div 0.1 \times V_{\text{反总}} \div (V_{\text{样}} \times \text{Cpr}) \div T$

$$= 8.9 \times (A - 0.0013) \div \text{Cpr}$$

(2) 按样本鲜重计算:

单位的定义: 每  $\text{g}$  组织每分钟催化  $1\ \mu\text{mol H}_2\text{O}_2$  降解定义为一个酶活力单位。

$\text{CAT}(\mu\text{mol/min/g 鲜重}) = (A - 0.0013) \div 0.1 \times V_{\text{反总}} \div (W \times V_{\text{样}} \div V_{\text{样总}}) \div T$

$$= 8.9 \times (A - 0.0013) \div W$$

$V_{\text{反总}}$ : 反应体系总体积,  $0.445\ \text{mL}$ ;  $V_{\text{样}}$ : 加入样本体积,  $0.05\ \text{mL}$ ;  $V_{\text{样总}}$ : 加入提取液体积,  $1\ \text{mL}$ ;

$T$ : 反应时间,  $10\ \text{min}$ ;  $W$ : 样本质量,  $\text{g}$ ;  $\text{Cpr}$ : 样本蛋白质浓度,  $\text{mg/mL}$ 。

### 注意事项:

1、预实验若发现酶活性过高 ( $A$  测定  $< 0.1$ ) , 可用提取液适当稀释样品后测定, 并在计算

公式中乘以相应稀释倍数。

2、若  $A$  对照  $< A$  测定, 一方面可能是酶活性过低, 可将反应时间  $10$  延长到  $30\text{min}$ , 另一方面可能样本中杂质干扰严重, 可将样本稀释  $5$  倍左右后测定, 并在计算公式中代入实际反应时间和乘以相应稀释倍数。