

过氧化氢酶 (Catalase, CAT) 试剂盒(紫外吸收法)说明书

微量法 100 管/96 样

注 意：正式测定前务必取 2-3 个预期差异较大的样本做预测定

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 H₂O₂清除酶，在活性氧清除系统中具有重要作用。

测定原理：

H₂O₂ 在 240nm 下有特征吸收峰，CAT 能够分解 H₂O₂，使反应溶液 240nm 下的吸光度随反应时间而下降，根据吸光度的变化率可计算出 CAT 活性。

需自备的仪器和用品：

紫外分光光度计/酶标仪、台式离心机、可调式移液器、微量石英比色皿/96 孔板（UV 板）、研钵、冰和蒸馏水

试剂组成和配制：

提取液：液体 100mL×1 瓶，4℃保存；

工作液：液体 24mL×1 瓶，4℃保存；

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 (10⁴ 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、 分光光度计或酶标仪预热 30min 以上，调节波长至 240nm，蒸馏水调零。
- 2、 测定前将 CAT 检测工作液在 37℃（哺乳动物）或 25℃（其它物种）水浴 10min 以上。
- 3、 准备 96 孔 UV 板一块（非普通酶标板，普通酶标板只能透过可见光，不能透过紫外光，检测波长小于 340nm 务必使用 UV 板）。
- 4、 在微量石英比色皿或 96 孔 UV 板中加入 10μL 样本和 190μL 工作液，混匀，记录 240nm 下初始吸光值 A1 和 1min 后的吸光值 A2。计算 ΔA=A1-A2。

注意事项：出现负值怎么办？

首先检查吸光值是否超过 3, 如果超过 3 很可能是没有用 UV 板, 请换用 UV 板。如果未超过 3, 仍然出现负值则检查反应过程是否产生气泡, 气泡多说明酶活性太高, 气泡影响产生了负值, 可以将样本用提取液稀释 10 倍后再检测。如果稀释样本或反应体系没有产生气泡仍然出现较小的负值, 说明该样本测不到该酶活。

CAT 活性计算:

a. 用微量石英比色皿测定的计算公式如下

1、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 1nmol H₂O₂ 降解定义为一个酶活力单位。

$$\text{CAT}(\text{nmol/min/mL}) = [\Delta A \times V_{\text{反总}} \div (\epsilon \times d) \times 10^9] \div V_{\text{样}} \div T = 459 \times \Delta A$$

2、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 mg 组织蛋白每分钟催化 1nmol H₂O₂ 降解定义为一个酶活力单位。

$$\text{CAT}(\text{nmol/min/mg prot}) = [\Delta A \times V_{\text{反总}} \div (\epsilon \times d) \times 10^9] \div (V_{\text{样}} \times C_{\text{pr}}) \div T = 459 \times \Delta A \div C_{\text{pr}}$$

(2) 按样本鲜重计算：

单位的定义：每 g 组织每分钟催化 1nmol H₂O₂ 降解定义为一个酶活力单位。

$$\text{CAT}(\text{nmol/min/g 鲜重}) = [\Delta A \times V_{\text{反总}} \div (\epsilon \times d) \times 10^9] \div (W \times V_{\text{样}} \div V_{\text{总}}) \div T = 459 \times \Delta A \div W$$

(3) 按细菌或细胞密度计算：

单位的定义：每 1 万个细菌或细胞每分钟催化 1nmol H₂O₂ 降解定义为一个酶活力单位。

$$\text{CAT}(\text{nmol/min}/10^4 \text{ cell}) = [\Delta A \times V_{\text{反总}} \div (\epsilon \times d) \times 10^9] \div (500 \times V_{\text{样}} \div V_{\text{总}}) \div T = 0.917 \times \Delta A$$

V_{反总}: 反应体系总体积, 2×10⁻⁴ L; ε: H₂O₂ 摩尔消光系数, 4.36×10⁴ L / mol / cm; d: 比色皿光径, 1cm;

V_样: 加入样本体积, 0.01 mL; V_总: 加入提取液体积, 1 mL; T: 反应时间, 1 min; W: 样本质量,

g; C_{pr}: 样本蛋白质浓度, mg/mL; 500: 细胞或细菌总数, 500 万。

b. 用 96 孔板测定的计算公式如下

1、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 1nmol H₂O₂ 降解定义为一个酶活力单位。

$$\text{CAT}(\text{nmol/min/mL}) = [\Delta A \times V_{\text{反总}} \div (\epsilon \times d) \times 10^9] \div V_{\text{样}} \div T = 918 \times \Delta A$$

2、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 mg 组织蛋白每分钟催化 1nmol H₂O₂ 降解定义为一个酶活力单位。

$$\text{CAT}(\text{nmol/min/mg prot}) = [\Delta A \times V_{\text{反总}} \div (\epsilon \times d) \times 10^9] \div (V_{\text{样}} \times C_{\text{pr}}) \div T = 918 \times \Delta A \div C_{\text{pr}}$$

(2) 按样本鲜重计算：

单位的定义：每 g 组织每分钟催化 1nmol H₂O₂ 降解定义为一个酶活力单位。

$$\text{CAT}(\text{nmol/min/g 鲜重}) = [\Delta A \times V_{\text{反总}} \div (\epsilon \times d) \times 10^9] \div (W \times V_{\text{样}} \div V_{\text{总}}) \div T = 918 \times \Delta A \div W$$

(3) 按细菌或细胞密度计算：

单位的定义：每 1 万个细菌或细胞每分钟催化 1nmol H₂O₂ 降解定义为一个酶活力单位。

$$\text{CAT}(\text{nmol/min}/10^4 \text{ cell}) = [\Delta A \times V_{\text{反总}} \div (\epsilon \times d) \times 10^9] \div (500 \times V_{\text{样}} \div V_{\text{总}}) \div T = 1.836 \times \Delta A$$

V_{反总}: 反应体系总体积, 2×10⁻⁴ L; ε: H₂O₂ 摩尔消光系数, 4.36×10⁴ L / mol / cm; d: 96 孔板光径,

0.5cm; V_样: 加入样本体积, 0.01 mL; V_总: 加入提取液体积, 1 mL; T: 反应时间, 1 min; W: 样本质量, g; C_{pr}: 样本蛋白质浓度, mg/mL; 500: 细胞或细菌总数, 500 万。