

过氧化氢酶 (Catalase, CAT) 试剂盒说明书

分光光度法 50 管/48 样

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。

组成:

产品名称	50T/48S	Storage
提取液: 液体	60ml	4°C
工作液: 液体	60ml	4°C
说明书	一份	

自备仪器和用品:

紫外分光光度计、台式离心机、可调式移液器、1ml 石英比色皿、研钵、冰和蒸馏水

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°C 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°C 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、分光光度计预热 30min 以上, 调节波长至 240nm 处, 蒸馏水调零。

2、测定前将 CAT 检测工作液 37°C (哺乳动物) 或 25°C (其它物种) 水浴 10min。

3、在 1ml 石英比色皿中加入 35 μ l 样本和 1ml 工作液，混匀，室温下立即测定 240nm 下的初始吸光值 A1 和 1min 后的吸光值 A2，计算 $\Delta A=A1-A2$

注意事项：出现负值怎么办？

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：

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。

$$\text{CAT}(\text{nmol}/\text{min}/\text{ml}) = [\Delta A \times V_{\text{反总}} \div (\epsilon \times d) \times 10^9] \div V_{\text{样}} \div T = 678 \times \Delta A$$

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。

$$\text{CAT}(\text{nmol}/\text{min}/\text{mg prot}) = [\Delta A \times V_{\text{反总}} \div (\epsilon \times d) \times 10^9] \div (V_{\text{样}} \times \text{Cpr}) \div T = 678 \times \Delta A \div \text{Cpr}$$

(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。

$$\text{CAT}(\text{nmol}/\text{min}/\text{g 鲜重}) = [\Delta A \times V_{\text{反总}} \div (\epsilon \times d) \times 10^9] \div (W \times V_{\text{样}} \div V_{\text{样总}}) \div T = 678 \times \Delta A \div W$$

(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。

$$\text{CAT}(\text{nmol}/\text{min}/10^4 \text{ cell}) = [\Delta A \times V_{\text{反总}} \div (\epsilon \times d) \times 10^9] \div (500 \times V_{\text{样}} \div V_{\text{样总}}) \div T = 1.356 \times \Delta A$$

V 反总：反应体系总体积，1.035 $\times 10^{-3}$ L； ϵ ：H₂O₂ 摩尔消光系数，4.36 $\times 10^4$ L / mol / cm；d：比色皿光径，1cm；V 样：加入样本体积，0.035 ml；V 样总：加入提取液体积，1 ml；T：反应时间，1 min；W：样本质量，g；Cpr：样本蛋白质浓度，mg/ml；500：细胞或细菌总数，500 万。