

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

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 $\Delta A = A1 - A2$ 。

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。

$$\text{CAT}(\text{nmol}/\text{min}/\text{mL}) = [\Delta A \times V_{\text{反总}} \div (\epsilon \times d) \times 109] \div V_{\text{样}} \div T = 459 \times \Delta A$$

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。

$$\text{CAT}(\text{nmol}/\text{min}/\text{mg prot}) = [\Delta A \times V_{\text{反总}} \div (\epsilon \times d) \times 109] \div (V_{\text{样}} \times \text{Cpr}) \div T = 459 \times \Delta A \div \text{Cpr}$$

(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。

$$\text{CAT}(\text{nmol}/\text{min}/\text{g 鲜重}) = [\Delta A \times V_{\text{反总}} \div (\epsilon \times d) \times 109] \div (W \times V_{\text{样}} \div V_{\text{样总}}) \div T = 459 \times \Delta A \div W$$

(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。

$$\text{CAT}(\text{nmol}/\text{min}/10^4 \text{ cell}) = [\Delta A \times V_{\text{反总}} \div (\epsilon \times d) \times 109] \div (500 \times V_{\text{样}} \div V_{\text{样总}}) \div T = 0.917 \times \Delta A$$

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。

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。

$$\text{CAT}(\text{nmol}/\text{min}/\text{mL}) = [\Delta A \times V_{\text{反总}} \div (\epsilon \times d) \times 109] \div V_{\text{样}} \div T = 918 \times \Delta A$$

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。

$$\text{CAT}(\text{nmol}/\text{min}/\text{mg prot}) = [\Delta A \times V_{\text{反总}} \div (\epsilon \times d) \times 109] \div (V_{\text{样}} \times \text{Cpr}) \div T = 918 \times \Delta A \div \text{Cpr}$$

(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。

$$\text{CAT}(\text{nmol}/\text{min}/\text{g 鲜重}) = [\Delta A \times V_{\text{反总}} \div (\epsilon \times d) \times 109] \div (W \times V_{\text{样}} \div V_{\text{样总}}) \div T = 918 \times \Delta A \div W$$

(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。

$$\text{CAT}(\text{nmol}/\text{min}/10^4 \text{ cell}) = [\Delta A \times V_{\text{反总}} \div (\epsilon \times d) \times 109] \div (500 \times V_{\text{样}} \div V_{\text{样总}}) \div T = 1.836 \times \Delta A$$

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。

