

过氧化氢酶 (Catalase, CAT) 试剂盒(钼酸铵比色法)说明书

微量法100管/96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10 mL×1瓶，4℃避光保存；

试剂二：液体25 mL×1瓶，常温保存；

试剂三：液体60 mL×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（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	空白管
样本	10	
试剂一	60	
混匀，25℃准确反应2 min		
试剂二	200	

试剂三	530	530
试剂二		200
提取液		10
试剂一		60
混匀，取200 $\mu$ L于96孔板立即测定A空白和A测定， $\Delta A=A_{\text{空白}}-A_{\text{测定}}$ 。空白管只需做一管。		

### CAT活性计算：

1、标准曲线： $y = 0.09x + 0.0013$   $R^2 = 1$   $x$ ：体系中过氧化氢浓度变化值 ( $\mu\text{mol/mL}$ )

$y$ ：吸光值差值 $\Delta A$

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。

$$\begin{aligned} \text{CAT}(\mu\text{mol}/\text{min}/\text{mL}) &= (\Delta A - 0.0013) \div 0.09 \times V_{\text{反总}} \div V_{\text{样}} \div T \\ &= 444.44 \times (\Delta A - 0.0013) \end{aligned}$$

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。

$$\begin{aligned} \text{CAT}(\mu\text{mol}/\text{min}/\text{mg prot}) &= (\Delta A - 0.0013) \div 0.09 \times V_{\text{反总}} \div (V_{\text{样}} \times C_{\text{pr}}) \div T \\ &= 444.44 \times (\Delta A - 0.0013) \div C_{\text{pr}} \end{aligned}$$

(2) 按样本鲜重计算：

单位的定义：每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。

$$\begin{aligned} \text{CAT}(\mu\text{mol}/\text{min}/\text{g 鲜重}) &= (\Delta A - 0.0013) \div 0.09 \times V \div (W \times V_{\text{样}} \div V_{\text{样总}}) \div T \\ &= 444.44 \times (\Delta A - 0.0013) \div W \end{aligned}$$

$V_{\text{反总}}$ ：反应体系总体积，0.8 mL； $V_{\text{样}}$ ：加入样本体积，0.01 mL； $V_{\text{样总}}$ ：加入提取液体积，1 mL； $T$ ：反应时间，2 min； $W$ ：样本质量，g； $C_{\text{pr}}$ ：样本蛋白质浓度，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空白 $<$ A测定，一方面可能是酶活性过低，可将反应时间2延长到5min,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。