

## 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 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：

H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> 在 240nm 下有特征吸收峰，CAT 能够分解 H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>，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	SR005-100T/96S	Storage
提取液：液体	100ml	4°C
工作液：液体	24ml	4°C
说明书	一份	

### 自备仪器和用品：

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

### 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°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°C (哺乳动物) 或 25°C (其它物种) 水浴 10min 以上。

最终解释权所有 © 伊势久 (江苏连云港) 生物科技有限责任公司，保留一切权利



- 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 10 $\mu$ l 样本和 190 $\mu$ l 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 H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> 降解定义为一个酶活力单位。

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

##### 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 H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> 降解定义为一个酶活力单位。

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

###### (2) 按样本鲜重计算：

单位的定义：每 g 组织每分钟催化 1nmol H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> 降解定义为一个酶活力单位。

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

###### (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 H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> 降解定义为一个酶活力单位。

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

V<sub>反总</sub>：反应体系总体积，2 $\times 10^{-4}$  L； $\epsilon$ ：H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> 摩尔消光系数，4.36 $\times 10^4$  L / mol / cm；d：比色皿光径，1cm；V<sub>样</sub>：加入样本体积，0.01 ml；V<sub>样总</sub>：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 H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> 降解定义为一个酶活力单位。

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

##### 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 H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> 降解定义为一个酶活力单位。

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

###### (2) 按样本鲜重计算：

单位的定义：每 g 组织每分钟催化 1nmol H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> 降解定义为一个酶活力单位。

最终解释权所有 © 伊势久（江苏连云港）生物科技有限责任公司，保留一切权利



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

(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 H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> 降解定义为一个酶活力单位。

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

V<sub>反总</sub>: 反应体系总体积, 2×10<sup>-4</sup> L; ε: H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> 摩尔消光系数, 4.36×10<sup>4</sup> L / mol / cm; d: 96 孔板光径, 0.5cm;

V<sub>样</sub>: 加入样本体积, 0.01 ml; V<sub>样总</sub>: 加入提取液体积, 1 ml; T: 反应时间, 1 min; W: 样本质量, g;

C<sub>pr</sub>: 样本蛋白质浓度, mg/ml; 500: 细胞或细菌总数, 500 万。

