

过氧化氢酶 (Catalase, CAT) 试剂盒 (钼酸铵比色法) 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:

过氧化氢能氧化 MoO₄²⁻成 MoO₅²⁻,MoO₅²⁻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(H₂MoO₄·XH₂O)_n 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。

组成:

产品名称	SR008-50T/48S	Storage
提取液: 酸性提取液	60ml	4°C
试剂一: 液体	6ml	4°C避光
试剂二: 液体	18ml	RT
试剂三: 液体	45ml	4°C
说明书	一份	

自备仪器和用品:

可见分光光度计、台式离心机、可调式移液器、1 ml 玻璃比色皿、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。

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



测定步骤:

- 1、分光光度计预热 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	15	
试剂一	90	
混匀，25℃准确反应 2 min		
试剂二	300	
试剂三	795	795
试剂二		300
提取液		15
试剂一		90
混匀，取 1ml 于 1ml 玻璃比色皿中立即测定 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: $y = 0.18x + 0.0013$ $R^2 = 1$ x: 体系中过氧化氢浓度变化值 (μmol/ml)
y: 吸光值差值 ΔA

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 1μmol H₂O₂ 降解定义为一个酶活力单位。

$$\text{CAT}(\mu\text{mol}/\text{min}/\text{ml}) = (\Delta A - 0.0013) \div 0.18 \times V_{\text{反总}} \div V_{\text{样}} \div T$$

$$= 222.22 \times (\Delta A - 0.0013)$$

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 1μmol H₂O₂ 降解定义为一个酶活力单位。

$$\text{CAT}(\mu\text{mol}/\text{min}/\text{mg prot}) = (\Delta A - 0.0013) \div 0.18 \times V_{\text{反总}} \div (V_{\text{样}} \times \text{Cpr}) \div T$$

$$= 222.22 \times (\Delta A - 0.0013) \div \text{Cpr}$$

(2) 按样本鲜重计算:

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

$$\text{CAT}(\mu\text{mol}/\text{min}/\text{g 鲜重}) = (\Delta A - 0.0013) \div 0.18 \times V_{\text{反总}} \div (W \times V_{\text{样}} \div V_{\text{样总}}) \div T$$

$$= 222.22 \times (\Delta A - 0.0013) \div W$$

V_{反总}: 反应体系总体积, 1.2 ml; V_样: 加入样本体积, 0.015 ml; V_{样总}: 加入提取液体积, 1 ml; T: 反应时间, 2 min; W: 样本质量, g; Cpr: 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。

