

## 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

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:

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。

### 组成:

产品名称	SR009-100T/96S	Storage
提取液: 酸性提取液	100ml	4°C
试剂一: 液体	15ml	4°C避光
试剂二: 液体	25ml	常温
试剂三: 液体	60ml	4°C
说明书	一份	

### 自备仪器和用品:

酶标仪、台式离心机、可调式移液器、96 孔板、研钵、冰和蒸馏水

### 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:

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



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°C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 200μl 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 (μmol/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 1μmol H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> 降解定义为一个酶活力单位。

$$\text{CAT}(\mu\text{mol}/\text{min}/\text{ml}) = (\Delta A - 0.0013) \div 0.09 \times V_{\text{反总}} \div V_{\text{样}} \div T$$

$$= 444.44 \times (\Delta A - 0.0013)$$

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

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

$$= 444.44 \times (\Delta A - 0.0013) \div C_{\text{pr}}$$

(2) 按样本鲜重计算：

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

$$\text{CAT}(\mu\text{mol}/\text{min}/\text{g 鲜重}) = (\Delta A - 0.0013) \div 0.09 \times V_{\text{反总}} \div (W \times V_{\text{样}} \div V_{\text{样总}}) \div T$$

$$= 444.44 \times (\Delta A - 0.0013) \div W$$

V 反总：反应体系总体积，0.8 ml；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，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。

