

过氧化氢酶（Catalase, CAT）试剂盒(钼酸铵比色法)说明书

100 管/96 样

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_2O_2 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_4^{2-} 成 MoO_5^{2-} , MoO_5^{2-} 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 $(H_2MoO_4 \cdot XH_2O)_n$ 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。

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（ 10^4 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 μL 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 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 1 μmol H₂O₂ 降解定义为一个酶活力单位。

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

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

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 $1 \mu\text{mol H}_2\text{O}_2$ 降解定义为一个酶活力单位。

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

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

(2) 按样本鲜重计算：

单位的定义：每 g 组织每分钟催化 $1 \mu\text{mol H}_2\text{O}_2$ 降解定义为一个酶活力单位。

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

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

$V_{\text{反总}}$ ：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； 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（ $A_{\text{测定}} < 0.1$ ），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 $A_{\text{空白}} < A_{\text{测定}}$ ，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。
-