

过氧化氢酶（Catalase, CAT）试剂盒说明书

分光光度法 50 管/48 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 H₂O₂ 清除酶，在活性氧清除系统中具有重要作用。

测定原理：

H₂O₂ 在 240nm 下有特征吸收峰，CAT 能够分解 H₂O₂，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。

需自备的仪器和用品：

紫外分光光度计、台式离心机、可调式移液器、1mL 石英比色皿、研钵、冰和蒸馏水

试剂组成和配制：

提取液：60mL×1 瓶，4℃ 保存；

试剂一：60mL×1 瓶，4℃ 保存；

试剂二：100 uL×3 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（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℃ 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、分光光度计预热 30min 以上，调节波长至 240nm 处，蒸馏水调零。

2、CAT 检测工作液的配制：用时在每瓶试剂二（100 uL）中加入 20mL 试剂一，充分混匀，作为工作液；用不完的试剂 4℃ 保存一周；

3、测定前将 CAT 检测工作液 37℃（哺乳动物）或 25℃（其它物种）水浴 10min。

4、取 1mL CAT 检测工作液于 1mL 石英比色皿中，再加入 35μL 样本，混匀；室温下立即测定 240nm 下的初始吸光值 A1 和 1min 后的吸光值 A2，计算 $\Delta A = A1 - A2$

CAT 活性计算：

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 H₂O₂ 降解定义为一个酶活力单位。

$$\text{CAT(U/mL)} = [\Delta A \times V_{\text{反总}} \div (\epsilon \times d) \times 10^9] \div V_{\text{样}} \div T = 678 \times \Delta A$$

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 H₂O₂ 降解定义为一个酶活力单位。

$$\text{CAT(U/mg prot)} = [\Delta A \times V_{\text{反总}} \div (\epsilon \times d) \times 10^9] \div (V_{\text{样}} \times \text{Cpr}) \div T = 678 \times \Delta A \div \text{Cpr}$$

（2）按样本鲜重计算：

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

$$\text{CAT(U/g 鲜重)} = [\Delta A \times V_{\text{反总}} \div (\epsilon \times d) \times 10^9] \div (W \times V_{\text{样}} \div V_{\text{样总}}) \div T = 678 \times \Delta A \div W$$

（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 H₂O₂ 降解定义为一个酶活力单位。

$$\text{CAT}(\text{U}/10^4 \text{ cell}) = [\Delta A \times V_{\text{反总}} \div (\epsilon \times d) \times 10^9] \div (500 \times V_{\text{样}} \div V_{\text{样总}}) \div T = 1.356 \times \Delta A$$

V_{反总}: 反应体系总体积, 1.035×10⁻³ L; ε: H₂O₂ 摩尔消光系数, 4.36×10⁴ L/mol/cm; d: 比色皿光径, 1cm; V_样: 加入样本体积, 0.035 mL; V_{样总}: 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。