

过氧化氢酶（CAT）试剂盒说明书

微量法

货号：AM0231

产品规格

100T/96 样

产品内容

使用前请认真核对试剂体积与瓶内体积是否一致，有疑问请及时联系工作人员。

试剂名称	规格	保存条件
提取液	100mL×1 瓶	4℃保存
工作液	24mL×1 瓶	4℃保存

产品简介

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。

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。

操作步骤：

一、粗酶液提取：

1、细菌、细胞或组织样品的制备

收集细菌或细胞到离心管内，离心后弃上清；按照每 500 万细菌或细胞加入 1mL 提取液，超声波破碎细菌或细胞(功率 20%或 200W,超声 3 秒，间隔 10 秒。重复 30 次); 8000g 4℃离心 10 分钟，取上清，置冰上待测。

称取约 0.1g 组织，加入 1mL 提取液进行冰浴匀浆。8000g 4℃离心 10 分钟，取上清，置冰上待测。

2、血清(浆)样品：直接检测。

二、操作步骤

1、分光光度计或酶标仪预热 30min,调节波长到 240nm,蒸馏水调零。

2、测定前将 CAT 检测工作液 37℃(哺乳动物)或 25℃(其他物种)水浴 10min。

3、加入 10μL 样本和 190μL 工作液，混匀 5s 或者在酶标仪上振动 5s 并立即计时，记录 240nm 下的初始吸光值 A1 和 1min 后的吸光值 A2。计算 $\Delta A = A1 - A2$

三、CAT 活性计算(用石英比色皿):

1、血清(浆)CAT 活力的计算:

单位的定义: 每毫升血清(浆)在反应体系中每分钟催化 1nmol H₂O₂降解定义为一个酶活力单位。
$$\text{CAT(U/mL)} = \text{反应总体积} \div \text{样本体积} \div \text{反应时间} \div \text{H}_2\text{O}_2\text{消光系数}(43.6 \times 10^3) \times \Delta A = 459 \times \Delta A$$

2、组织 CAT 活力计算:

(1) 按样本蛋白浓度计算:

单位的定义: 每 mg 组织蛋白在反应体系中每分钟催化 1nmol H₂O₂降解定义为一个酶活力单位。

$$\text{CAT(U/mg prot)} = \text{反应总体积} \div \text{样本体积} \div \text{反应时间} \div \text{H}_2\text{O}_2\text{消光系数}(43.6 \times 10^3) \times \Delta A \div \text{蛋白质浓度(mg/mL)} = 459 \times \Delta A \div \text{蛋白质浓度(mg/mL)}$$

(2) 按样本鲜重计算:

单位的定义: 每 g 组织在反应体系中每分钟催化 1nmol H₂O₂ 降解定义为一个酶活力单位。

$$\text{CAT(U/gmass)} = \text{反应总体积} \div \text{样本体积} \div \text{反应时间} \div \text{H}_2\text{O}_2\text{消光系数}(4.36 \times 10^4) \times \Delta A \div \text{样本鲜重(g/mL)} = 459 \times \Delta A \div \text{样本鲜重(g/mL)}$$

3、细菌或细胞中 CAT 活力计算:

单位的定义: 每 1 万个细菌或细胞在每分钟反应体系中每分钟催化 1nmol H₂O₂降解定义为一个酶活力单位。

$$\text{CAT (U/10}^4\text{cell)} = \text{反应总体积} \div \text{样本体积} \div \text{反应时间} \div \text{H}_2\text{O}_2\text{消光系数}(4.36 \times 10^4) \times \Delta A \div \text{细胞密度}(10^4\text{cell/mL)} = 0.917 \times \Delta A$$

V 反总: 反应体系总体积, 2×10⁻⁴L; ε: NADH 摩尔吸光系数, 4.36×10⁴L/mol/cm; d: 比色皿光径, 1cm;

V 样: 加入样本体积, 0.01ml; V 样总: 加入提取液体积, 1ml; T: 反应时间, 1min。

W, 样本质量, g; Cpr: 上清液蛋白浓度, mg/ml; 500: 细胞或细菌总数, 500 万。

CAT 活性计算(用 96 孔板):

1、血清(浆)CAT 活力的计算:

单位的定义: 每毫升血清(浆)在反应体系中每分钟催化 1nmol H₂O₂降解定义为一个酶活力单位。

$$\text{CAT(U/mL)} = \text{反应总体积} \div \text{样本体积} \div \text{反应时间} \div \text{H}_2\text{O}_2\text{消光系数}(4.36 \times 10^4) \times \Delta A = 918 \times \Delta A$$

2、组织 CAT 活力计算:

(1)按样本蛋白浓度计算:

单位的定义：每 mg 组织蛋白在反应体系中每分钟催化 1mmol H₂O₂降解定义为一个酶活力单位。

$$\text{CAT(U/mg prot)} = \text{反应总体积} \div \text{样本体积} \div \text{反应时间} \div \text{H}_2\text{O}_2\text{消光系数}(4.36 \times 10^4) \times \Delta A \div \text{蛋白质浓度(mg/mL)} = 918 \times \Delta A \div \text{蛋白质浓度 (mg/mL)}$$

(2) 按样本鲜重计算：

单位的定义：每 g 组织在反应体系中每分钟催化 1nmol H₂O₂ 降解定义为一个酶活力单位。

$$\text{CAT(U/g mass)} = \text{反应总体积} \div \text{样本体积} \div \text{反应时间} \div \text{H}_2\text{O}_2\text{消光系数}(4.36 \times 10^4) \times \Delta A \div \text{样本鲜重(g/mL)} = 918 \times \Delta A \div \text{样本鲜重 (g/mL)}$$

3、细菌或细胞中 CAT 活力计算：

单位的定义：每 1 万个细菌或细胞在每分钟反应体系中每分钟催化 1nmolH₂O₂降解定义为一个酶活力单位。

$$\text{CAT(U/10}^4\text{cell)} = \text{反应总体积} \div \text{样本体积} \div \text{反应时间} \div \text{H}_2\text{O}_2\text{消光系数}(4.36 \times 10^4) \times \Delta A \div \text{细胞密度}(10^4 \text{cell/mL}) = 1.836 \times \Delta A$$

V 反总：反应体系总体积，2×10⁻⁴L；ε：NADH 摩尔吸光系数，4.36×10⁴L/mol/cm；d：比色皿光径，0.5cm；

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

上清液蛋白浓度，mg/ml；500：细胞或细菌总数，500 万。

- 1、预实验如果发现酶活性过高(其实 OD 值过大),可用提取液适当稀释样品。
- 2、如果酶活性过低，延长反应时间(3 分钟之内),并将反应时间准确代入计算公式。