

过氧化氢酶（CAT）试剂盒说明书

分光光度法

货号：AM0221

产品规格

50T/48S

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	60mL×1 瓶	4℃保存
试剂一	60mL×1 瓶	4℃保存
试剂二	100 μ L×3 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 H_2O_2 清除酶，在活性氧清除系统中具有重要作用。

H_2O_2 在 240nm 下有特征吸收峰，CAT 能够分解 H_2O_2 ，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。

实验中所需的仪器和试剂：

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

操作步骤：

一、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：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 100-1000:1 的比例（建议 500 万细胞或细胞加入 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。

组织：按照组织质量 (g)：提取液体积 (ml) 为 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 10 分钟，取上清，置冰上待测。

2、血清(浆)样品：直接检测。

二、CAT 测定操作

- 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 检测工作液的配置: 用时在每瓶试剂二 (100 μ L) 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℃ (其他物种) 水浴 10min。
- 4、取 1mlCAT 检测工作液于 1ml 石英比色皿中, 再加入 35 μ L 样本, 混匀 5s; 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 $\Delta A=A1-A2$

三、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)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。

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

- 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。

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

- (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。

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

- 3、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。

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

V 反总: 反应体系总体积, 1.035 $\times 10^{-3}$ L; ϵ : NADH 摩尔吸光系数, 4.36 $\times 10^4$ L/mol/cm; d: 比色皿光径, 1cm; V 样: 加入样本体积, 0.035ml; 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。