

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

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

$$\text{CAT} (\mu\text{mol/min/mL}) = (\Delta A - 0.0013) \div 0.09 \times V_{\text{反总}} \div V_{\text{样}} \div T$$
$$= 444.44 \times (\Delta A - 0.0013)$$

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。

$$\text{CAT} (\mu\text{mol/min/g 鲜重}) = (\Delta A - 0.0013) \div 0.09 \times V_{\text{反总}} \div (W \times V_{\text{样}} \div V_{\text{样总}}) \div T$$
$$= 444.44 \times (\Delta A - 0.0013) \div W$$

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 ($A_{\text{测定}} < 0.1$), 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。