

上海茁彩生物科技有限公司
ZCIBIO Technology Co., Ltd



生化检测原理示意图

Cat. NO: ZC-S0351

Size: 100T/96S

过氧化氢酶 (CAT) 检测试剂盒说明书

微量法

*正式测定前务必取 2-3 个预期差异较大的样本做预测定

一、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。

二、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。

三、需自备的仪器和用品:

紫外分光光度计/酶标仪、台式离心机、可调式移液器、微量石英比色皿/96 孔板 (UV 板)、研钵、冰和蒸馏水

四、试剂的组成和配置:

种类	试剂规格	储存条件	使用方法及注意事项
提取液	液体 100mL×1 瓶	4℃保存	—
工作液	液体 24mL×1 瓶	4℃保存	—

五、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。

六、测定步骤:

1. 分光光度计或酶标仪预热 30min 以上, 调节波长至 240nm, 蒸馏水调零。
2. 测定前将 CAT 检测工作液在 37°C (哺乳动物) 或 25°C (其它物种) 水浴 10min 以上。
3. 准备 96 孔 UV 板一块 (非普通酶标板, 普通酶标板只能透过可见光, 不能透过紫外光, 检测波长小于 340nm 务必使用 UV 板)。
4. 在微量石英比色皿或 96 孔 UV 板中加入 10 μ L 样本和 190 μ L 工作液, 混匀, 记录 240nm 下初始吸光值 A1 和 1min 后的吸光值 A2。计算 $\Delta A = A1 - A2$ 。

七、注意事项:

出现负值怎么办?

首先检查吸光值是否超过 3, 如果超过 3 很可能是没有用 UV 板, 请换用 UV 板。如果未超过 3, 仍然出现负值则检查反应过程是否产生气泡, 气泡多说明酶活性太高, 气泡影响产生了负值, 可以将样本用提取液稀释 10 倍后再检测。如果稀释样本或反应体系没有产生气泡仍然出现较小的负值, 说明该样本测不到该酶活。

八、CAT 活性计算:

a. 用微量石英比色皿测定的计算公式如下

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。

$$\text{CAT (nmol/min/mL)} = [\Delta A \times V_{\text{反总}} \div (\epsilon \times d) \times 10^9] \div V_{\text{样}} \div T = 459 \times \Delta A$$

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。

$$\begin{aligned} \text{CAT (nmol/min/mg prot)} &= [\Delta A \times V_{\text{反总}} \div (\epsilon \times d) \times 10^9] \div (V_{\text{样}} \times C_{\text{pr}}) \div T \\ &= 459 \times \Delta A \div C_{\text{pr}} \end{aligned}$$

(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。

$$\begin{aligned} \text{CAT (nmol/min/g 鲜重)} &= [\Delta A \times V_{\text{反总}} \div (\epsilon \times d) \times 10^9] \div (W \times V_{\text{样}} \div V_{\text{样总}}) \div T \\ &= 459 \times \Delta A \div W \end{aligned}$$

(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。

$$\text{CAT}(\text{nmol}/\text{min}/10^4 \text{ cell}) = [\Delta A \times V_{\text{反总}} \div (\epsilon \times d) \times 10^9] \div (500 \times V_{\text{样}} \div V_{\text{样总}}) \div T \\ = 0.917 \times \Delta A$$

V 反总：反应体系总体积， 2×10^{-4} L； ϵ ：H₂O₂ 摩尔消光系数， 4.36×10^4 L / mol / cm；
d：比色皿光径，1cm；V 样：加入样本体积，0.01 mL；V 样总：加入提取液体积，1mL；T：反应时间，1min；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。

b. 用 96 孔板测定的计算公式如下

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。

$$\text{CAT}(\text{nmol}/\text{min}/\text{mL}) = [\Delta A \times V_{\text{反总}} \div (\epsilon \times d) \times 10^9] \div V_{\text{样}} \div T = 918 \times \Delta A$$

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。

$$\text{CAT}(\text{nmol}/\text{min}/\text{mg prot}) = [\Delta A \times V_{\text{反总}} \div (\epsilon \times d) \times 10^9] \div (V_{\text{样}} \times \text{Cpr}) \div T \\ = 918 \times \Delta A \div \text{Cpr}$$

(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。

$$\text{CAT}(\text{nmol}/\text{min}/\text{g 鲜重}) = [\Delta A \times V_{\text{反总}} \div (\epsilon \times d) \times 10^9] \div (W \times V_{\text{样}} \div V_{\text{样总}}) \div T \\ = 918 \times \Delta A \div W$$

(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。

$$\text{CAT}(\text{nmol}/\text{min}/10^4 \text{ cell}) = [\Delta A \times V_{\text{反总}} \div (\epsilon \times d) \times 10^9] \div (500 \times V_{\text{样}} \div V_{\text{样总}}) \div T \\ = 1.836 \times \Delta A$$

V 反总：反应体系总体积， 2×10^{-4} L； ϵ ：H₂O₂ 摩尔消光系数， 4.36×10^4 L / mol / cm；
d：96 孔板光径，0.5cm；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，1min；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。