

过氧化氢酶(CAT)活性检测试剂盒说明书

Catalase Assay Kit

紫外分光光度法

货号: AK096

规格: 50T/48S

产品组成及保存条件:

编号	规格	储存条件
提取液 ES08	60ml×1 瓶	4℃保存;
AK096-A	60ml×1 瓶	4℃保存;
AK096-B	100ul×3 瓶	4℃保存;
CAT 检测工作液的配制: 用时在每瓶 AK096-B 中加入 20ml AK096-A, 充分混匀, 作为工作液; 用不完的试剂 4℃保存一周。		

※ 正式测定前务必取 2-3 个预期差异较大的样本做预测定。

简介:

意义: 过氧化氢酶 (Catalase, 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。

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。

自备用品:

紫外分光光度计、1ml 石英比色皿、台式离心机、水浴锅、可调式移液枪、研钵、冰和双蒸水。

粗酶液提取:

1. 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 ES08 (mL) 为 500~1000: 1 的比例 (建议 500 万细菌或细胞加入 1mL 提取液 ES08, 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); 然后 8000g 4℃离心 10min, 取上清, 置冰上待测。
2. 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。
3. 血清 (浆) 样品: 直接检测。

测定步骤:

1. 紫外分光光度计预热 30min 以上, 调节波长至 240nm, 蒸馏水调零。
2. 试剂准备见产品组成及保存条件列表。
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 1mL CAT 检测工作液于 1mL 石英比色皿中, 再加入 35 μL 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 ΔA=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) 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。

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

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。

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

(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 H_2O_2 降解定义为一个酶活力单位。

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

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 H_2O_2 降解定义为一个酶活力单位。

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

注: $V_{\text{反总}}$: 反应体系总体积, $1.035 \times 10^{-3} \text{L}$; ϵ : H_2O_2 摩尔吸光系数, $4.36 \times 10^4 \text{L/mol/cm}$; d : 比色皿光径, 1cm; $V_{\text{样}}$: 加入样本体积, 0.035ml; $V_{\text{样总}}$: 加入提取液体积, 1ml; T : 反应时间, 1min; W , 样本质量(g); C_{pr} : 上清液蛋白浓度, mg/ml; 500: 细胞或细菌总数, 500 万; 10^9 : 单位换算系数, $1 \text{ mol} = 10^9 \text{ nmol}$.