

过氧化氢酶(CAT)活性检测试剂盒说明书

Catalase Assay Kit

微量法

货号: AK097

规格: 100T/96S

产品组成及保存条件:

编号	规格	储存条件
提取液 ES08	100mL×1 瓶	4℃保存;
AK097-A	30ml×1 瓶	4℃保存;
AK097-B	125ul×1 瓶	4℃保存;
CAT 检测工作液的配置: 用时在 AK097-B 中加入 25ml AK097-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/酶标仪、微量石英比色皿/96 孔板 (UV 板)、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. 紫外分光光度计或酶标仪预热 30min 以上, 调节波长至 240nm, 蒸馏水调零。
2. CAT 检测工作液的配制: 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. 在微量石英比色皿或 96 孔板 (UV 板) 中加入 10μL 样本和 190μL 工作液, 立即混匀并计时, 记录 240nm 下初始吸光值 A1 和 1min 后的吸光值 A2。计算 ΔA=A1-A2。

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。

计算公式: CAT (U/mL) = [ΔA×V 反总÷(ε×d)×10⁹]÷V 样÷T = 459×ΔA

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。

计算公式：CAT (U/mg prot) = $[\Delta A \times V_{\text{反总}} \div (\epsilon \times d) \times 10^9] \div (Cpr \times V_{\text{样}}) \div T = 459 \times \Delta A \div Cpr$

(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。

计算公式：CAT (U/g 鲜重) = $[\Delta A \times V_{\text{反总}} \div (\epsilon \times d) \times 10^9] \div (V_{\text{样}} \div V_{\text{样总}} \times W) \div T = 459 \times \Delta A \div W$

(3) 按细菌或细胞数量计算：

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。

计算公式：CAT (U/10⁴ cell) = $[\Delta A \times V_{\text{反总}} \div (\epsilon \times d) \times 10^9] \div (V_{\text{样}} \div V_{\text{样总}} \times 500) \div T = 0.917 \times \Delta A$

注： V_{反总}：反应体系总体积，2×10⁻⁴ L；ε：H₂O₂ 摩尔消光系数，4.36×10⁴ 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，1 mL；T：反应时间，1 min；W：样本鲜重，g；Cpr：样本蛋白质浓度，mg/mL；500：细胞或细菌总数，500 万；10⁹：单位换算系数，1 mol=10⁹nmol。

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

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

(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。

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

(3) 按细菌或细胞数量计算：

单位的定义：每 1 万个细菌或细胞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/10⁴ cell) = $[\Delta A \times V_{\text{反总}} \div (\epsilon \times d) \times 10^9] \div (V_{\text{样}} \div V_{\text{样总}} \times 500) \div T = 1.834 \times \Delta A$

注： V_{反总}：反应体系总体积，2×10⁻⁴ L；ε：H₂O₂ 摩尔消光系数，4.36×10⁴ 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，1 min；W：样本鲜重，g；Cpr：样本蛋白质浓度，mg/mL；500：细胞或细菌总数，500 万；10⁹：单位换算系数，1 mol=10⁹nmol。