

## 过氧化氢酶（Catalase, CAT）试剂盒(紫外吸收法)说明书

微量法 100 管/96 样

**注 意：**正式测定前务必取 2-3 个预期差异较大的样本做预测定

### 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：

$H_2O_2$  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。

### 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

### 试剂组成和配制：

提取液：液体 100mL×1 瓶，4℃保存；

工作液：液体 24mL×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、 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℃（哺乳动物）或 25℃（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 10μL 样本和 190μL 工作液，混匀，记录 240nm 下初始吸光值  $A_1$  和 1min 后的吸光值  $A_2$ 。计算  $\Delta A = A_1 - A_2$ 。

**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。

#### **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 H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> 降解定义为一个酶活力单位。

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

###### **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 H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> 降解定义为一个酶活力单位。

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

###### **（2）按样本鲜重计算：**

单位的定义：每 g 组织每分钟催化 1nmol H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> 降解定义为一个酶活力单位。

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

###### **（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 H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> 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<sup>-4</sup> L；ε：H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> 摩尔消光系数，4.36×10<sup>4</sup> 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 H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> 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 H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> 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 H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> 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 H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> 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<sup>-4</sup> L；ε：H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> 摩尔消光系数，4.36×10<sup>4</sup> 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：样本质量，g；Cpr：样本蛋白质浓度，mg/mL；500：细胞或细菌总数，500 万。

---