

过氧化氢酶(CAT)试剂盒说明书

(货号: PB1003F48 分光法 48样)

有效期: 3个月

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。

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。

需自备的仪器和用品:

紫外分光光度计、台式离心机、可调式移液器、1mL石英比色皿、研钵、冰和蒸馏水

试剂组成和配制:

提取液: 液体60ml×1瓶, 4℃保存;

试剂一: 液体60ml×1瓶, 4℃保存;

试剂二: 液体100 μl×3瓶, 4℃保存。

粗酶液提取:

1、细菌、细胞或组织样品的制备

收集细菌或细胞到离心管内, 离心后弃上清; 按照每200万细菌或细胞加入400 μL提取液, 超声波破碎细菌或细胞(功率20%, 超声3s, 间隔10s, 重复30次); 8000g 4℃离心10min, 取上清, 置冰上待测。

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、CAT检测工作液的配制: 用时在每瓶试剂二(100 μL)中加入20mL试剂一, 充分混匀, 作为工作液。

2、测定前将CAT检测工作液37℃(哺乳动物)或25℃(其它物种)水浴10min。

3、取1mLCAT检测工作液于1mL石英比色皿中, 再加入35 μL粗酶液, 混匀; 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 $\Delta A = A_1 - A_2$

CAT活性计算:

1、血清（浆）CAT活力的计算:

单位的定义：每升血清（浆）在反应体系中每分钟催化1 μ mol H₂O₂降解定义为一个酶活力单位。

$$\text{CAT (U/ml)} = \text{反应总体积 (1035 } \mu\text{L)} \div \text{样本体积 (35 } \mu\text{L)} \div \text{反应时间 (1min)} \div \text{H}_2\text{O}_2\text{消光系数 (43.6} \times 10^{-3}) \times \Delta A = 678 \times \Delta A$$

2、组织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。

$$\text{CAT (U/mg prot)} = \text{反应总体积 (1035 } \mu\text{L)} \div \text{样本体积 (35 } \mu\text{L)} \div \text{反应时间 (1min)} \div \text{H}_2\text{O}_2\text{消光系数 (43.6} \times 10^{-3}) \times \Delta A \div \text{蛋白质浓度 (mg/mL)} = 678 \times \Delta A \div \text{蛋白质浓度 (mg/mL)}$$

(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。

$$\text{CAT (U/g 鲜重)} = \text{反应总体积 (1035 } \mu\text{L)} \div \text{样本体积 (35 } \mu\text{L)} \div \text{反应时间 (1min)} \div \text{H}_2\text{O}_2\text{消光系数 (43.6} \times 10^{-3}) \times \Delta A \div \text{样品质量 (g/mL)} = 678 \times \Delta A \div \text{样品质量 (g/mL)}$$

3、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。

$$\text{CAT (U/mg prot)} = \text{反应总体积 (1035 } \mu\text{L)} \div \text{样本体积 (35 } \mu\text{L)} \div \text{反应时间 (1min)} \div \text{H}_2\text{O}_2\text{消光系数 (43.6} \times 10^{-3}) \times \Delta A \div \text{蛋白质浓度 (mg/mL)} = 678 \times \Delta A \div \text{蛋白质浓度 (mg/mL)}$$

(2) 按细菌或细胞密度计算:

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。

$$\text{CAT (U/104 cell)} = \text{反应总体积 (1035 } \mu\text{L)} \div \text{样本体积 (35 } \mu\text{L)} \div \text{反应时间 (1min)} \div \text{H}_2\text{O}_2\text{消光系数 (43.6} \times 10^{-3}) \times \Delta A \div \text{细胞密度 (10}^4 \text{ cell /mL)} = 678 \times \Delta A \div \text{细胞}$$