

过氧化氢酶(CAT)检测试剂盒说明书

(货号: PB1003W196 微量法 196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 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/UV 板、研钵、冰和蒸馏水

试剂组成和配制:

提取液: 液体 100ml×2 瓶, 4℃保存;

试剂一: 液体 60ml×1 瓶, 4℃保存;

试剂二: 液体 125 μ l×2 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500 万细菌或细胞加入1mL 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、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: 用时在试剂二中加入25mL 试剂一, 充分混匀, 作为工作液。

3、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。

4、在微量石英比色皿或96 孔板中加入10 μ L 样本和190 μ L 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 $\Delta A = A1 - A2$ 。

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 H_2O_2 降解定义为一个酶活力单位。

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

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

(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。

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

(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。

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

V 反总: 反应体系总体积, 2×10^{-4} L; ϵ : H₂O₂ 摩尔消光系数, $4.36 \times 10^4 \text{ mol/L/cm}$; 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: 样品质量, 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)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。

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

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。

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

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

(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。

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

V 反总: 反应体系总体积, 2×10^{-4} L; ϵ : H₂O₂ 摩尔消光系数, $4.36 \times 10^4 \text{ mol/L/cm}$; 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: 样品质量, g; Cpr: 样本蛋白质浓度, mg/mL; 500: 细胞或细菌总数, 500 万。