

过氧化氢酶 (CAT) 检测试剂盒说明书

(货号: ADS-W-KY002 微板法 96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/自备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;

试剂一: 液体30ml×1 瓶, 4℃保存;

试剂二: 液体125 μ l×1 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 H_2O_2 降解定义为一个酶活力单位。

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

(2) 按样本鲜重计算:

单位的定义: 每 g 组织每分钟催化 1nmol H_2O_2 降解定义为一个酶活力单位。

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

(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。

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

V 反总: 反应体系总体积, 2×10⁻⁴ L; ε: H₂O₂ 摩尔消光系数, 4.36×10⁴mol/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。

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

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。

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

(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。

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

(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。

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

V 反总: 反应体系总体积, 2×10⁻⁴ L; ε: H₂O₂ 摩尔消光系数, 4.36×10⁴mol/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。