

## 过氧化氢酶（Catalase, CAT）试剂盒（钼酸铵比色法）说明书

分光光度法 50 管/24 样

### 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<sub>2</sub>O<sub>2</sub>清除酶，在活性氧清除系统中具有重要作用。

### 测定原理：

过氧化氢能氧化 MoO<sub>4</sub><sup>2-</sup>成 MoO<sub>5</sub><sup>2-</sup>,MoO<sub>5</sub><sup>2-</sup>接受氢氧根的电子成键，分子间立即脱水缩合，得到稳定的黄色复合物(H<sub>2</sub>MoO<sub>4</sub>·XH<sub>2</sub>O)<sub>n</sub>在 405nm 处有强烈吸收峰，其吸光值和过氧化氢浓度成线性关系。测定出体系剩余过氧化氢在 405nm 的吸光值即可反映 CAT 的催化活性。

### 需自备的仪器和用品：

可见分光光度计、台式离心机、可调式移液器、1mL 玻璃比色皿、研钵、冰和蒸馏水

### 试剂组成和配制：

提取液：液体 60 mL×1 瓶，4℃保存；

试剂一：液体 6 mL×1 瓶，4℃避光保存；

试剂二：液体 18 mL×1 瓶，常温保存；

试剂三：液体 45 mL×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<sup>4</sup>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、 分光光度计预热 30min 以上，调节波长至 405 nm。

2、 在 EP 管中加入下列试剂

试剂名称（ $\mu$ L）	测定管	空白管
样本	15	
试剂一	90	
混匀，25℃准确反应 2 min		
试剂二	300	

试剂三	795	795
试剂二		300
提取液		15
试剂一		90
混匀，取 1mL 于 1mL 玻璃比色皿中立即测定 A 空白和 A 测定， $\Delta A = A_{\text{空白}} - A_{\text{测定}}$ 。空白管只需做一管。		

CAT 活性计算：

- 1、标准曲线： $y = 0.18x + 0.0013$   $R^2 = 1$       x: 体系中过氧化氢浓度变化值 ( $\mu\text{mol/mL}$ )  
y: 吸光值差值  $\Delta A$

2、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  $1 \mu\text{mol H}_2\text{O}_2$  降解定义为一个酶活力单位。

$$\text{CAT} (\mu\text{mol}/\text{min}/\text{mL}) = (\Delta A - 0.0013) \div 0.18 \times V_{\text{反总}} \div V_{\text{样}} \div T$$

$$= 222.22 \times (\Delta A - 0.0013)$$

3、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  $1 \mu\text{mol H}_2\text{O}_2$  降解定义为一个酶活力单位。

$$\text{CAT} (\mu\text{mol}/\text{min}/\text{mg prot}) = (\Delta A - 0.0013) \div 0.18 \times V_{\text{反总}} \div (V_{\text{样}} \times \text{Cpr}) \div T$$

$$= 222.22 \times (\Delta A - 0.0013) \div \text{Cpr}$$

(2) 按样本鲜重计算：

单位的定义：每 g 组织每分钟催化  $1 \mu\text{mol H}_2\text{O}_2$  降解定义为一个酶活力单位。

$$\text{CAT} (\mu\text{mol}/\text{min}/\text{g 鲜重}) = (\Delta A - 0.0013) \div 0.18 \times V_{\text{反总}} \div (W \times V_{\text{样}} \div V_{\text{样总}}) \div T$$

$$= 222.22 \times (\Delta A - 0.0013) \div W$$

V 反总：反应体系总体积，1.2 mL；V 样：加入样本体积，0.015 mL；V 样总：加入提取液体积，1 mL；T：反应时间，2 min；W：样本质量，g；Cpr：样本蛋白质浓度，mg/mL。

**注意事项：**

- 1、预实验若发现酶活性过高 ( $A_{\text{测定}} < 0.1$ )，可用提取液适当稀释样品后测定，并在计算公式中乘以相应稀释倍数。
- 2、若  $A_{\text{空白}} < A_{\text{测定}}$ ，一方面可能是酶活性过低，可将反应时间 2 延长到 5min，另一方面可能样本中杂质干扰严重，可将样本稀释 5 倍左右后测定，并在计算公式中代入实际反应时间和乘以相应稀释倍数。