

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_2O_2 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_4^{2-} 成 MoO_5^{2-} , MoO_5^{2-} 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 $(H_2MoO_4 \cdot XH_2O)_n$ 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°C 保存;

试剂一: 液体 6 mL×1 瓶, 4°C 避光保存;

试剂二: 液体 17 mL×1 瓶, 常温保存; (过饱和试剂, 如有结晶析出, 可 37°C 加热搅拌溶解)

试剂三: 液体 45 mL×1 瓶, 4°C 保存; (过饱和试剂, 如有絮状沉淀, 可 37°C 加热搅拌溶解)

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°C 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°C 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 (μL)	测定管	试剂名称 (μL)	对照管
样本	150	试剂一	90
试剂一	90	试剂二	300
混匀, 25°C 准确反应 10 min		试剂三	795
试剂二	300	混匀	
试剂三	795	样本	150
混匀, 取 1mL 于 1mL 玻璃比色皿中立即测定 A 测定和 A 对照, $\Delta A = A_{\text{对照}} - A_{\text{测定}}$ 。每个测定管需设一个对照管。			

CAT 活性计算:

1、标准曲线: $y = 0.2x + 0.0013$ $R^2 = 1$ x: 体系中过氧化氢浓度变化值($\mu\text{mol/mL}$)
y: 吸光值差值 ΔA

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。

$$\text{CAT}(\mu\text{mol/min/mL}) = (\Delta A - 0.0013) \div 0.2 \times V_{\text{反总}} \div V_{\text{样}} \div T$$
$$= 4.45 \times (\Delta A - 0.0013)$$

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。

$$\text{CAT}(\mu\text{mol/min/mg prot}) = (\Delta A - 0.0013) \div 0.2 \times V_{\text{反总}} \div (V_{\text{样}} \times C_{\text{pr}}) \div T$$
$$= 4.45 \times (\Delta A - 0.0013) \div C_{\text{pr}}$$

(2) 按样本鲜重计算:

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

$$\text{CAT}(\mu\text{mol/min/g 鲜重}) = (\Delta A - 0.0013) \div 0.2 \times V_{\text{反总}} \div (W \times V_{\text{样}} \div V_{\text{样总}}) \div T$$
$$= 4.45 \times (\Delta A - 0.0013) \div W$$

V 反总: 反应体系总体积, 1.335 mL; V 样: 加入样本体积, 0.15 mL; V 样总: 加入提取液体积, 1 mL; T: 反应时间, 10 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 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 对照 $< A$ 测定, 一方面可能是酶活性过低, 可将反应时间 10min 延长到 30min, 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。