过氧化氢酶（CAT）活性检测试剂盒说明书

微量法

注意：正式测定前务必取 2-3 个预期差异较大的样本做预测定
规格：100T/96S

产品内容：

- 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 125μL×1 瓶，4℃保存。

产品说明：

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。

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/酶标仪、台式离心机、可调式移液器、微量石英比色皿/96 孔（UV 板）、研钵、冰和蒸馏水

操作步骤：

一、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。

二、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、准备96孔UV板一块（非普通酶标板，普通酶标板只能透过可见光，不能透过紫外光，检测波长小于 340nm 务必使用UV板）。

5、在微量石英比色皿或 96 孔板中加入 10μL 样本和 190μL 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 $\Delta A = A_1 - A_2$ 。

三、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 H₂O₂ 降解定义为一个酶活力单位。

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

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。

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

(2) 按样本鲜重计算：

单位的定义：每 g 组织每分钟催化 1nmol H₂O₂ 降解定义为一个酶活力单位。

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

(3) 按细菌或细胞数量计算：

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，4.36×10⁴ L/mol/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：样本鲜重，g；Cpr：样本蛋白质浓度，mg/mL；500：细胞或细菌总数，500 万；10⁹：单位换算系数，1 mol=10⁹nmol。

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。

$$\text{CAT(U/mL)} = [\Delta A \times V \text{ 反总} \div (\epsilon \times d) \times 10^9] \div V \text{ 样} \div T = 764.5 \times \Delta A$$

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。

$$\text{CAT(U/mg prot)} = [\Delta A \times V \text{ 反总} \div (\epsilon \times d) \times 10^9] \div (\text{Cpr} \times V \text{ 样}) \div T = 764.5 \times \Delta A \div \text{Cpr}$$

(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。

$$\text{CAT(U/g 鲜重)} = [\Delta A \times V \text{ 反总} \div (\epsilon \times d) \times 10^9] \div (V \text{ 样} \div V \text{ 样总} \times W) \div T = 764.5 \times \Delta A \div W$$

(3) 按细菌或细胞数量计算：

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。

$$\text{CAT(U/10}^4 \text{ cell)} = [\Delta A \times V \text{ 反总} \div (\epsilon \times d) \times 10^9] \div (V \text{ 样} \div V \text{ 样总} \times 500) \div T = 1.529 \times \Delta A$$

V 反总：反应体系总体积，2×10⁻⁴ L；ε：H₂O₂ 摩尔消光系数，4.36×10⁴ L/mol/cm；d：96 孔板光径，0.6cm；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：样本鲜重，g；Cpr：样本蛋白质浓度，mg/mL；500：细胞或细菌总数，500 万；10⁹：单位换算系数，1 mol=10⁹nmol。

注意事项：

出现负值怎么办？首先检查吸光值是否超过 3，如果超过3很可能是没有用UV 板，请换用 UV 板。

如果未超过 3，仍然出现负值则检查反应过程是否产生气泡，气泡多说明酶活性太高，气泡影响产生了负值，可以将样本用提取液稀释 10 倍后再检测。如果稀释样本或反应体系没有产生气泡仍然出现较小的负值，说明该样本测不到该酶活。