

过氧化氢酶（CAT）活性检测试剂盒说明书

紫外分光光度法

注意：本产品试剂有所变动，请注意并严格按照该说明书操作。

货号：AC10105

规格：50T/48S

产品组成：使用前请认真核对试剂体积与瓶内体积是否一致，有疑问请及时联系本公司工作人员。

试剂名称	规格	保存条件
提取液	液体 60 mL×1 瓶	2-8℃保存
试剂一	液体 60 mL×1 瓶	2-8℃保存
试剂二	液体 300 μL×1 瓶	2-8℃保存

溶液的配制：

- 1、试剂二：液体置于试剂瓶内 EP 管中，使用前需先离心。
- 2、检测工作液的配制：取 50μL 试剂二加入 13mL 试剂一，充分混匀（约 13T），作为工作液，现用现配；或者根据比例配制。

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。

注意：实验之前建议选择 2-3 个预期差异大的样本做预实验。如果样本吸光值不在测量范围内建议稀释或者增加样本量进行检测。

需自备的仪器和用品：

紫外分光光度计、台式离心机、可调式移液器、1mL 石英比色皿、研钵/匀浆器、冰和蒸馏水。

操作步骤：

一、样本处理（可适当调整待测样本量，具体比例可以参考文献）

1、细菌、细胞或组织样本的制备

a、细菌或培养细胞：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（10⁴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（功率 200w，超声 3 秒，间隔 10 秒，重复 30 次）；8000g 4℃离心 10 分钟，取上清，置冰上待测。

b、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 10 分钟，取上清，置冰上待测。

2、血清（浆）样本：直接检测。

二、测定步骤

1、分光光度计预热 30min 以上，调节波长至 240nm 处，蒸馏水调零。

2、测定前将 CAT 检测工作液 37℃（哺乳动物）或 25℃（其他物种）水浴 10min。

3、取 1mL CAT 检测工作液于 1mL 石英比色皿中，再加入 35 μ L 样本，混匀 5s；室温下立即测定 240nm 下的初始吸光值 A1 和 1min 后的吸光值 A2。计算 $\Delta A=A1-A2$ 。

三、CAT 活性计算

1、血清（浆）CAT 活力的计算：

单位的定义：每 mL 血清（浆）在反应体系中每分钟催化 1 μ mol H₂O₂ 降解定义为一个酶活力单位。

$$\text{CAT (U/mL)} = [\Delta A \times V_{\text{反总}} \div (\epsilon \times d) \times 10^6] \div V_{\text{样}} \div T = 678 \times \Delta A$$

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 1 μ mol H₂O₂ 降解定义为一个酶活力单位。

$$\text{CAT (U/mg prot)} = [\Delta A \times V_{\text{反总}} \div (\epsilon \times d) \times 10^6] \div (V_{\text{样}} \times C_{\text{pr}}) \div T = 678 \times \Delta A \div C_{\text{pr}}$$

(2) 按样本质量计算：

单位的定义：每 g 组织在反应体系中每分钟催化 1 μ mol H₂O₂ 降解定义为一个酶活力单位。

$$\text{CAT (U/g 质量)} = [\Delta A \times V_{\text{反总}} \div (\epsilon \times d) \times 10^6] \div (W \times V_{\text{样}} \div V_{\text{样总}}) \div T = 678 \times \Delta A \div W$$

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 1 μ mol H₂O₂ 降解定义为一个酶活力单位。

$$\text{CAT (U/10}^4 \text{ cell)} = [\Delta A \times V_{\text{反总}} \div (\epsilon \times d) \times 10^6] \div (500 \times V_{\text{样}} \div V_{\text{样总}}) \div T = 1.356 \times \Delta A$$

V 反总：反应体系总体积，1.035 $\times 10^{-3}$ L； ϵ ：H₂O₂ 摩尔吸光系数，43.6 L/mol/cm；d：比色皿光径，1cm；V 样：加入样本体积，0.035mL；V 样总：加入提取液体积，1mL；T：反应时间，1min；W：样本质量，g；Cpr：上清液蛋白浓度，mg/mL；500：细胞或细菌总数，500 万；10⁶：单位换算系数，1mol=10⁶ μ mol。

注意事项：

如果反应液有大量气泡产生，将样本用蒸馏水稀释后再进行测定。

相关发表文献：

[1] Zhang Z, Liu H, Sun C, et al. A C2H2 zinc-finger protein OsZFP213 interacts with OsMAPK3 to enhance salt tolerance in rice[J]. Journal of plant physiology, 2018, 229: 100-110.

[2] Yin Y J, Chen C J, Guo S W, et al. The fight against Panax notoginseng root-rot disease using zingiberaceae essential oils as potential weapons[J]. Frontiers in plant science, 2018, 9: 1346.

[3] Yang Y, Li J, Wei C, et al. Amelioration of nonalcoholic fatty liver disease by swertiamarin in fructose-fed mice[J]. Phytomedicine, 2019, 59: 152782.

[4] Chen G, Jia Z, Wang L, et al. Effect of acute exposure of saxitoxin on development of zebrafish embryos (Danio rerio)[J]. Environmental Research, 2020: 109432.

参考文献：

[1] Catalase in vitro.[J]. Methods Enzymol, 105:121-126.

[2] Johansson L H, Borg L A H. A spectrophotometric method for determination of catalase activity in small tissue samples[J]. Analytical biochemistry, 1988, 174(1): 331-336.