过氧化氢酶（Catalase，CAT）试剂盒(钼酸铵比色法)说明书

100 管/96 样

微量法 100 管/96 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：

酶标仪、台式离心机、可调式移液器、96 孔板、研钵、冰和蒸馏水

试剂组成和配制：

提取液：液体 100 mL×1 瓶，4℃保存；

试剂一：液体 10 mL×1 瓶，4℃避光保存；

试剂二：液体 25 mL×1 瓶，常温保存；

试剂三：液体 60 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（10^4 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℃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、 酶标仪预热 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	空白管
样本	10	
试剂一	60	
混匀，25℃准确反应 2 min		
试剂二	200	
试剂三	530	530
试剂二		200
提取液		10
试剂一		60
混匀，取 200μL 于 96 孔板立即测定 A 空白和 A 测定，ΔA=A 空白-A 测定。空白管只需做一管。		

CAT 活性计算：

1、标准曲线：$y = 0.09x + 0.0013$　　$R^2 = 1$　　x：体系中过氧化氢浓度变化值（μmol/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 μ mol H_2O_2 降解定义为一个酶活力单位。

CAT(μ mol /min/mL)= =(ΔA-0.0013)÷0.09×V 反总÷V 样÷T

=444.44×(ΔA-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 μ mol H_2O_2 降解定义为一个酶活力单位。

CAT(μ mol/min/mg prot)=(ΔA-0.0013)÷0.09×V 反总÷(V 样×Cpr) ÷T

=444.44×(ΔA-0.0013)÷Cpr

（2）按样本鲜重计算：

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

CAT(μ mol/min/g 鲜重)=(ΔA-0.0013)÷0.09×V÷（W× V 样÷V 样总）÷T

=444.44×(ΔA-0.0013)÷W

V 反总：反应体系总体积，0.8 mL；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，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 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 空白＜A 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。