



过氧化氢酶检测试剂盒 (50T)

一般说明

过氧化氢酶是一种抗氧化酶，其功能是催化过氧化氢(H_2O_2)的分解，生成水和氧气。过氧化氢在真核细胞内以多种氧化酶和超氧化歧化酶的副产物形式存在。过氧化氢在细胞内的聚集会引发细胞内 DNA，蛋白质和脂质的氧化，从而导致基因突变和细胞死亡。过氧化氢酶可去除细胞内的 H_2O_2 ，保护活细胞免受氧化损伤，过氧化氢酶在氧化胁迫相关疾病中的作用已得到了广泛研究。本试剂盒使用一种氧化还原显色剂来直接测定过氧化氢酶对 H_2O_2 的降解，其在吸光度 (570nm) 或荧光强度 (530/585nm) 直接与样品中的过氧化氢酶活性成正比，可高效检测酶活。检测范围：0.2-5 U/L 过氧化氢酶。

适用范围

各种生物样品（如血清、血浆、尿液、细胞组织等）的过氧化氢酶活性。

试剂盒组成 和保存

缓冲液： 15 mL	-20°C 保存
酶试剂： 60 μ L	-20°C 保存
显色剂： 60 μ L	-20°C 保存
H_2O_2 溶液: 100 μ L 3%	-20°C 保存
对照试剂： 8 μ L	-20°C 保存

样品准备:

组织 (~10 mg) 和细胞 (~ 10^6) 提取物用 200 μ L 缓冲液匀浆并以 14,000rpm 的转速离心 10 分钟制备而成。取上层清液用于检测。

注意：已知含巯基的试剂（如 β -巯基乙醇，二巯苏糖醇）可干扰这项检测，因此应确保样品中此类试剂浓度 < 5 μ M。

检测步骤

1. 试剂准备：将所有试剂放至室温。打开试管前先短暂离心。检测过程中将已解冻的酶试剂始终置于冰上。比色检测使用透明平底 96 孔板。荧光检测使用黑色 96 孔板。

样品和对照：将 10 μ L 样品移至 96 孔板的各个孔内。另外，针对每次检测实验，均需设置空白对照（10 μ L 缓冲液）。

添加 400 μ L 缓冲液至对照试剂的离心管中混匀。将 10 μ L 混匀后的对照品移入孔板。

注：（1）对于未知的样品，设置数个稀释梯度以确保过氧化氢酶活性在 0.2 ~ 5 U/L 的线性检测范围内。（2）试剂盒中的过氧化氢酶是作为阳性对照以确定检测试剂是起作用的，不应用于计算样品中过氧化氢酶活性。

2. 酶试剂

将 5 μ L 3% H_2O_2 与 914 μ L H_2O 混合（最终浓度为 4.8 mM）。然后将 1 μ L 4.8mM H_2O_2 和 95 μ L 检测缓冲液混匀，可为每个孔中样品、阳性对照或空白对照准备充足的 50 μ M H_2O_2 底物。注：稀释的 H_2O_2 是不稳定的，因此最好在每次实验时现用现稀释。取 90 μ L 50 μ M 的底物添加至每个孔中，开始过氧化氢酶反应。轻敲平板使其快速混匀。室温培养 30 min。此时可继续进行步骤 3 和 4 操作。



CAT050

3. H₂O₂ 标准曲线

混合 40 μL 4.8 mM H₂O₂ 与 440 μL H₂O 使得 H₂O₂ 的浓度为 400 μM。据下表配置各浓度的 H₂O₂ 溶液。各取 10 μL 移入 96 孔板各孔内，加入 90 μL 检测缓冲液。

标号	H ₂ O ₂ + H ₂ O	μL	H ₂ O ₂ (μM)
1	100μL + 0μL	100	400
2	60μL + 40μL	100	240
3	30μL + 70μL	100	120
4	0μL + 100μL	100	0

4. 显色反应

按照下列比例为每个反应孔（样品、阳性对照和 H₂O₂ 标准液）准备足够的反应试剂，即将 102 μL 缓冲液、1 μL 酶试剂和 1 μL 显色剂混合。在 30 分钟培养（步骤 2）结束后，向每孔加入 100 μL 反应试剂。轻轻振荡混匀，继续室温下反应 10 分钟。

5. 读取 570nm 波长处的吸光度或 λ em/exc = 585 nm/530nm 下的荧光强度。

浓度计算

从标准品的测值中减去空白对照品的测值（#4），绘制 ΔOD 或 ΔF 与标准浓度的曲线。测定斜率(Slope)并计算样品中过氧化氢酶活性：

$$\text{过氧化氢酶} = \frac{R_{\text{样本空白}} - R_{\text{样本}}}{\text{Slope} \times 10^{-4} \text{M} \times 30 \text{ min}} \times n$$

R_{样本空白} 和 R_{样本} 分别是样本空白和样本的吸光度或荧光强度读数，n 是样品稀释系数。

单位定义

在 pH 7.0, 25°C, 过氧化氢底物浓度 50mM 条件下，一单位过氧化氢酶每分钟可以分解 1μmol 过氧化氢生成氧气和水。

注意事项： 本产品仅供研究用，使用过程中应严格遵循实验安全措施。

