



## 过氧化物酶活性检测试剂盒荧光法

规格：微量法 96 样

检测原理：荧光法/比色法

编号：TW56844

### 注意

正式测定前务必取 3 - 5 个预期差异较大的样本做预测定。

### 测定意义

POD (EC 1.11.1.7) 广泛存在于动物、植物、微生物和培养细胞中，可催化过氧化氢氧化酚类和胺类化合物，具有消除过氧化氢和酚类、胺类毒性的双重作用。

### 测定原理

当  $H_2O_2$  过量时，Amplex™ Red 试剂可用作过氧化物酶活性的超灵敏测定试剂。在存在过氧化物酶的情况下，Amplex™ Red 试剂与  $H_2O_2$  以 1:1 的化学计量比发生反应，生成红色荧光氧化产物试卤灵。

### 需自备的仪器和用品

天平、离心机、荧光酶标仪/酶标仪、移液器、涡旋混匀仪、黑色 96 孔板/酶标板、匀浆器。

### 试剂组成和配制

试剂名称	规格	数目	贮藏	
提取液	液体 100mL	x1	4°C	
试剂一	液体 200uL	x1	4°C,避光	取 10 uL 试剂一和 990 uL 提取液混匀即为试剂一 A



试剂二	粉剂	x1	-20°C,避光	临用前加入 6mL 提取液溶解, 分装冻存, 避免反复冻融。
试剂三	粉剂	x1	-20°C,避光	临用前加入 78uL 试剂四 (预先恢复至室温) 溶解, 现用现配, 不可保存。
试剂四	液体	x1	4°C,避光	

## 样品处理

**细菌或培养细胞：**按照细菌或细胞数量 ( $10^4$ 个)：提取液体积 (mL) 为 500：1 的比例，超声波破碎细菌或细胞 (冰浴, 功率 20%或 200W, 超声 3s, 间隔 7s, 重复 30 次); 10000g 4°C离心 10min, 取上清, 置冰上待测。

**组织样本：**称取约 0.1g 样本, 加入 1mL 提取液, 冰浴匀浆, 10000g, 4°C离心 10min, 取上清液, 置冰上待测。

**血清 (浆) 等液体样品：**用提取液稀释或直接进行检测。

## 实验准备

(1) 荧光酶标仪预热 30min 以上, 激发波长为 530nm, 发射波长为 590nm。

或者酶标仪预热 30min 以上, 波长设置 560nm

(2) 工作液按照试剂三：试剂一 A：提取液=1：10：89 的比例依据用量配置。

## 测定操作表

	测定管
样本( $\mu$ L)	50
工作液( $\mu$ L)	50
混匀, 室温避光荧光光度 Ex/Em=530/590nm 测定初始荧光值 A1 和 30min 之后荧光	



值 A2 (或者酶标仪 560nm 测定吸光值)。ΔA 测定=A2-A1。

**注意：**限定测定管荧光强度在 200-2000 之间，如果荧光强度大于 2000 可用提取液稀释，如果荧光强度小于 200 可以增加样本量。

### **附：标准曲线制作过程**

#### **实验准备：**

荧光酶标仪预热 30min 以上，激发波长为 540nm，发射波长为 590nm。

或者酶标仪预热 30min 以上，波长设置 560nm

工作液按照试剂三：试剂二：提取液=1：2：97 的比例依据用量配置。

取 5μL 试剂一 A 加入 995μL 提取液混匀即得 100μmol/L 的 H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> 母液，把母液用蒸馏水稀释成以下浓度梯度的标准品：0，2，4，6，8，10μmol/L。

### **测定操作表**

	空白管	标准管
标准品(μL)	-	50
提取液(μL)	50	-
工作液	50	50

混匀，室温避光荧光光度 Ex/Em=530/590nm 测定初始荧光值 A1 和 30min 之后荧光值 A2 (或者酶标仪 560nm 测定吸光值)。ΔA 测定=A2-A1。

### **建立标准曲线**

以 H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> 的浓度 (μmol/L) 为横坐标，ΔA 为纵坐标建立标准曲线得到 y=ax+b。

### **过氧化物酶活性计算**

#### **(1) 按照样本质量计算**

单位的定义：每 g 组织每分钟消耗 1μmol 过氧化氢定义为一个酶活力单位。



过氧化物酶活性(U/g) =  $(\Delta A - b) \div a \times V_{\text{提}} \div W \div T$

### (2) 按照细菌/细胞数量计算

单位的定义：每  $10^4$  cell 每分钟消耗  $1\mu\text{mol}$  过氧化氢定义为一个酶活力单位。

过氧化物酶活性(U/ $10^4$  cell) =  $(\Delta A - b) \div a \times V_{\text{提}} \div 500 \div T$

### (3) 按照液体体积计算

单位的定义：每 mL 液体每分钟消耗  $1\mu\text{mol}$  过氧化氢定义为一个酶活力单位。

过氧化物酶活性(U/L) =  $(\Delta A - b) \div a \div 1000 \div T$

V 提：样本提取体积，0.001L

500：细胞数量，万

W：样本重量，g

T：反应时间，30min

## 预实验的意义

### 比色法检测试剂盒预实验非常重要

- 1、确定该试剂盒是否适合客户的样本检测，以免造成试剂盒和样本的浪费（比如低表达处理的样本）；
- 2、熟悉生化试剂盒的操作流程，尤其是初次使用生化试剂盒测定；
- 3、确定样本的处理方法及稀释倍数是否合适；
- 4、了解实验过程中可能出现的实验现象或问题，以便于及时作出调整；
- 5、通过 3 - 5 组预实验，判断试剂盒对于样本的最佳适应稀释浓度范围，指导实验样本稀释比例。