

过氧化氢和过氧化物酶活性试剂盒荧光法

规格：微量法 96 样

检测原理：荧光法/比色法

编号：ml300882

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：

H_2O_2 是生物体内最常见的活性氧分子，主要由 SOD 和 XOD 等催化产生，由 CAT 和 POD 等催化降解。 H_2O_2 不仅是重要的活性氧之一，也是活性氧相互转化的枢纽。一方面， H_2O_2 可以直接或间接地氧化细胞内核酸，蛋白质等生物大分子，并使细胞膜遭受损害，从而加速细胞的衰老和解体；另一方面 H_2O_2 也是许多氧化应急反应中的关键调节因子。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：

该测定试剂盒使用 Amplex™ Red 试剂 (10-乙酰基-3,7-二羟基吩噻嗪) 检测过氧化氢 (H_2O_2) 或过氧化物酶活性。Amplex™ Red 试剂与辣根过氧化物酶 (HRP) 配合使用以检测从生物样品 (包括细胞) 中释放或在酶偶联反应中生成的 H_2O_2 。此外，当 H_2O_2 过量时，Amplex™ Red 试剂也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。

删除[...]: 、

试剂组成和配制:

试剂名称	规格	数目	贮藏	
提取液	液体 100mL	x2	4°C	
试剂一	液体 200uL	x1	4°C,避光	取 10μL 试剂一和 990 μL 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	x2	-20°C,避光	临用前加入 78μL 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	

删除[...]: 取 8.85 uL 试剂一和 991.15 uL 缓冲液混匀即为试剂一 A

删除[...]: 临用前加入每支 77.75uL 试剂四 (预先恢复至室温) 溶解, 现用现配, 不可保存

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。

一. 测定过氧化氢含量

实验准备:

(1) 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

(2) 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。

(3) 取 5μL 试剂一 A 加入 995μL 提取液混匀即得 100μmol/L 的 H₂O₂ 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。

删除[...]: 缓冲液

删除[...]: μM

删除[...]: μM

测定操作表:

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

混匀, 室温避光孵育 30min, 荧光光度 Ex/Em=540/590nm 测定 (或者酶标仪 560nm 测定吸光值)。ΔA 测定=测定管-空白管, ΔA 标准=标准管-空白管。

***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。

建立标准曲线

以 H₂O₂ 的浓度 (umol/L) 为横坐标, ΔA 为纵坐标建立标准曲线得到 y=ax+b。

过氧化氢含量计算

(1) 按照样本质量计算

$$\text{过氧化氢含量}(\mu\text{mol/g}) = (\Delta A - b) \div a \times V_{\text{提}} \div W$$

(2) 按照细菌/细胞数量计算

$$\text{过氧化氢含量}(\mu\text{mol}/10^4 \text{ cell}) = (\Delta A - b) \div a \times V_{\text{提}} \div 500$$

(3) 按照液体体积计算

$$\text{过氧化氢含量}(\mu\text{mol/L}) = (\Delta A - b) \div a$$

V 提: 样本提取体积, 0.001L 500: 细胞数量, 万

W: 样本重量, g

二.测定过氧化物酶活性

实验准备:

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

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。

取 5 μ L 试剂一 A 加入 995 μ L 提取液混匀即得 100 μ mol/L 的 H₂O₂ 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, 10 μ mol/L。

测定操作表:

	测定管
样本 (μ L)	50
工作液 (μ L)	50
混匀, 室温避光荧光光度 Ex/Em=530/590nm 测定初始荧光值 <u>A1</u> 和 30min 之后荧光值 <u>A2</u> (<u>或者酶标仪 560nm 测定吸光值</u>)。 ΔA 测定= <u>A2-A1</u> 。	

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。

(标准曲线使用一: 测定过氧化氢含量里的标准曲线, 以 H₂O₂ 的浓度 (μ mol/L) 为横坐标, ΔA 为纵坐标建立标准曲线得到 $y=ax+b$)

删除[...]: 按照样本质量计算

过氧化氢含量(μ mol/g) = $(\Delta A - b) \div a \times V_{提} \div W$

按照细菌/细胞数量计算

过氧化氢含量(μ mol/ 10^4 cell) = $(\Delta A - b) \div a \times V_{提} \div 500$

按照液体体积计算

过氧化氢含量(μ mol/mL) = $(\Delta A - b) \div a \times V_{提} \div V_{液}$

V_提: 样本提取体积, 0.001L

500: 细胞

数量, 万

V_液: 液体样本加入体积, 0.1mL

W: 样本重量,

g

删除[...]: 缓冲液

删除[...]: μ M

删除[...]: μ M

删除[...]: 30min

删除[...]: 0min

删除[...]: .

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 1 μmol 过氧化氢定义为一个酶活力单位。

设置格式[...]: 字体: 非倾斜

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

删除[...]: μmol

(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 μmol 过氧化氢定义为一个酶活力单位。

删除[...]: μmol

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

(3) 按照液体体积计算

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

删除[...]: μmol

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

删除[...]:

V 提: 样本提取体积, 0.001L

500: 细胞数量, 万

设置格式[...]: 缩进: 左 1 字符, 首行缩进: 3.7 毫米, 正文文本

删除[...]: $\times V_{\text{提}} \div V_{\text{液}}$

W: 样本重量, g

T: 反应时间, 30min

删除[...]: V 液: 液体样本加入体积, 0.1mL

删除[...]:

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。