

过氧化物酶活性试剂盒荧光法

规格：微量法 96 样

编号：ml300883

检测原理：荧光法/比色法

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℃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℃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 (μL)	50
工作液 (μL)	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 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：

	空白管	标准管
标准品 (μ L)	-	50
提取液 (μ L)	50	-
工作液	50	50
混匀，室温避光孵育 30min，荧光光度 Ex/Em=540/590nm 测定。 ΔA 标准=标准管-空白管。		

建立标准曲线

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 $y=ax+b$ 。

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 μ mol 过氧化氢定义为一个酶活力单位。

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

(2) 按照细菌/细胞数量计算

单位的定义：每 10⁴ cell 每分钟消耗 1 μ mol 过氧化氢定义为一个酶活力单位。

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

(3) 按照液体体积计算

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

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

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。