

过氧化物酶活性检测试剂盒(荧光法)

规格：微量法 96样

编号：JLC_K14855

检测原理：荧光法/比色法

注意

1、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℃	
试剂一	液体200uL	x1	4℃,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℃,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℃,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℃, 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）。 $\Delta A_{\text{测定}}=A_2-A_1$ 。	

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 H_2O_2 的浓度（ $\mu\text{mol/L}$ ）为横坐标， ΔA 为纵坐标建立标准曲线得到 $y=ax+b$ 。

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
样本 (μ L)	-	50
工作液 (μ L)	50	-
	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。

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。

过氧化物酶活性(U/10⁴ 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。

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适应稀释浓度范围，指导实验样本稀释比例
- 。