

过氧化氢和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_K14854

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

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。

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取8.85 uL试剂一和991.15 uL缓冲液混匀即为试剂一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。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。
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。

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缓冲液提取液混匀即得100μmol/LμM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/LμM。

测定操作表

1、在EP管中依次操作

	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）。 $\Delta A_{\text{测定}} = \text{测定管} - \text{空白管}$ ， $\Delta A_{\text{标准}} = \text{标准管} - \text{空白管}$ 。

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 H_2O_2 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

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

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

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

$V_{\text{提}}$: 样本提取体积, 0.001L

500: 细胞数量, 万

W: 样本重量, g

按照样本质量计算

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

按照细菌/细胞数量计算

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

按照液体体积计算

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

$V_{\text{提}}$: 样本提取体积, 0.001L

500: 细胞数量, 万

$V_{\text{液}}$: 液体样本加入体积, 0.1mL

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5μL试剂一A加入995μL缓冲液提取液混匀即得100μmol/LμM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/LμM。

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=A30min2-A0min1。	

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 (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1μmolumol过氧化氢定义为一个酶活力单位。

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

(2) 按照细菌/细胞数量计算

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

过氧化物酶活性(U/10⁴ cell) = $(\Delta A - b) \div a \times V_{提} \div 500 \div T$

(3) 按照液体体积计算

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

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

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

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。