



上海源叶生物科技有限公司
Shanghai yuanye Bio-Technology Co., Ltd
电话: 021-61312973 传真: 021-55068248
网址: www.shyuanye.com
邮箱: shyysw@sina.com

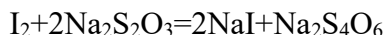
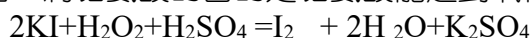
H₂O₂ 作为基质来测定过氧化氢酶活性

概述:

过氧化氢酶对过氧化氢 (H₂O₂) 起作用, 使过氧化氢分解。根据对残存的过氧化氢的测定来计算已经分解了的过氧化氢量。

在硫酸酸性的条件下 H₂O₂ 作为氧化剂对碘化钾 (KI) 起氧化作用, 生成碘 (I₂)。1mol 的 H₂O₂ 生成 1mol 的碘 (I₂)。(碘化钾作为还原剂对过氧化氢起作用)。用硫代硫酸钠 (Na₂S₂O₃ 还原剂) 来对生成的碘进行滴定, 根据滴定来测定过氧化氢的量。1mol 的碘相当于 2mol 的硫代硫酸钠。因而, 1mol 的过氧化氢 (H₂O₂) 相当于 2mol 的硫代硫酸钠。滴定将近结束时, 利用利用碘和淀粉反应进行最终滴定。(碘和淀粉反应可以呈现深青紫色)。

加一滴钼氨酸的目的是钼氨酸能起到氧化还原反应的触媒作用。



酶活的定义:

1 活力单位=30°C, pH7.0, 1 分钟分解 1μmol 的过氧化氢所需的酶量。

计算公式

$$U = \frac{(B-A) \times 2.5 \text{ fn} \div 5}{n} \quad \text{————— (1)}$$

B=空白的滴定值

A=反应的滴定值

5=反应的时间

2.5=0.005mol/L 硫代硫酸钠溶液 1ml 相当于过氧化氢 2.5μmol

f=0.005/L 硫代硫酸钠溶液的因数

n=稀释倍数

活力的测定

一、溶液的配制

1 磷酸缓冲液

a 取磷酸氢二钠 (2H₂O) 17.8g 溶于 500ml 蒸馏水配制成 A 溶液

b 取磷酸二氢钠 (2H₂O) 15.6g 溶于 500ml 蒸馏水配制成 B 溶液

A 溶液的 PH 约为 9, B 溶液的 PH 约为 4

将 B 溶液缓慢倒入 A 溶液中同时搅拌, 最终调 PH 为 7.0。

此时缓冲液为 200mM。

2 酶液用缓冲液

取磷酸缓冲液 50ml, 加上 100ml 乙二醇混合, 加蒸馏水配制成 1000ml 的缓冲液, 缓冲液为 10mM。

3 配制 1N 硫酸溶液

4 配制 KI 溶液

取 10gKI 加蒸馏水至 100ml。

5 配制钼氨酸溶液

取 1g 钼氨酸加蒸馏水至 100ml。

6 配制硫代硫酸钠溶液

用 1N/10 硫代硫酸钠标准品(市场采购)加纯水稀释 20 倍, 成为 N/200 浓度。

7 淀粉指示剂



上海源叶生物科技有限公司
Shanghai yuanye Bio-Technology Co., Ltd
电话: 021-61312973 传真: 021-55068248
网址: www.shyuanye.com
邮箱: shyysw@sina.com

将可溶性淀粉 0.5g 放入到 90ml 热水中 2—3 分钟后取出冷却后加纯水至 100ml。

二、酶溶液的配制：酶液按 1：50 的比例配置。

将酶液取 1ml 稀释到 15000 倍（用磷酸缓冲液稀释）

基质溶液的配制

将先配制好的 200mM 的磷酸缓冲液取 100ml，加水 300ml 配制成 400ml 的 50mM 的缓冲溶液。

1ml 的 30 % 过氧化氢/80ml（50mM 的缓冲溶液）=80 倍

5ml/50ml=800 倍

三、测试顺序

- 1 将 1ml 的酶液放入试管中，在 30℃ 恒温水槽中保温 5 分钟。
- 2 将基质溶液在 30℃ 预热 5 分钟，取 5ml 放入酶液试管中使之反应开始，并准确记时。
- 3 反应 5 分钟后，加 2ml 的 1N 硫酸对酶进行杀活处理。
- 4 加入 1ml 10 % KI 溶液和 1 滴 1 % 钼氨酸，用 0.005N 硫代硫酸钠溶液将反应后的溶液进行滴定，记录所需的体积（以 ml 为单位）作为滴定值。
- 5 按（1）（3）（2）（4）的顺序操作为空白，记录所需硫代硫酸钠的体积作为 B 滴定值。
计算公式同（1）。