



辣根过氧化物酶活力测定

一、试剂

- 1、0.1M pH6.0 磷酸缓冲液, (12.3mL 0.2M Na_2HPO_4 溶液加 87.7ml 0.2M NaH_2PO_4 溶液再加 H_2O 100ml混匀, 即为 0.1M pH 6.0 磷酸缓冲液)。

- 2、酶溶液: 0.4mg/ml

在分析天平上称取 2--3mg (0.0020--0.0030g)的辣根过氧化物酶的冻干粉, 用 0.1M pH 6.0 的磷酸缓冲液配成 0.4mg/ml的溶液 (如: 2mg样品, 则加 5ml缓冲液), 用该溶液测RZ: 即读取 403nm , 275nm波长的光密度 (A)。

$$\frac{A_{403\text{nm}}}{A_{275\text{nm}}} = \text{RZ}$$

(测过 RZ 后 取该酶液 20 μl 用磷酸缓冲液稀释至 5.0ml, (250 倍稀释) 用于活性测定)。

- 3、0.15mol/L H_2O_2 溶液: 取 30% H_2O_2 0.17ml加 H_2O 9.83ml。
- 4、5%邻苯三酚溶液: 50mg/ml (即称取 200mg 左右的邻苯三酚, 除上 50 得的商数 , 即需加水的量, 如 240mg 加水 4.8ml 就为 5%的邻苯三酚溶液。

二、活性测定: (在 20 °C 恒温下反应)

反应系统组成:

0.1M pH6.0 磷酸缓冲液 0.32ml

0.15M H_2O_2 溶液 0.16ml

5%邻苯三酚溶液 0.32ml

H_2O 2.10ml

上述溶液在比色皿中混合后, 加入 0.1ml上述酶溶液, 在 420nm波长处每 20 秒读取光吸

收, 共读 3 分钟左右。取最初 20 秒的光吸收变化 $\Delta A_{420\text{nm}}$, 按公式 $U/\text{mg} = \Delta A \left(\frac{10^3}{0.64} \right)$ 计算活力, 记录测定时的温度。