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

H_2O_2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（H_2O_2）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 H_2O_2 作为氧化剂对碘化钾(KI)起氧化作用，生成碘(I_2)。1mol 的 H_2O_2 生成 1mol 的碘（I_2）。（碘化钾作为还原剂对过氧化氢起作用）。用硫代硫酸钠（$Na_2S_2O_3$ 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（H_2O_2）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。

$2KI+H_2O_2+H_2SO_4 = I_2 + 2H_2O+K_2SO_4$

$I_2+2Na_2S_2O_3=2NaI+Na_2S_4O_6$

酶活的定义：

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

计算公式

$U=(B-A)\times 2.5fn \div 5$　　————（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 2.5umol

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 容于 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

将可容性淀粉 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 度恒温水槽中保温 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 1ml10％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）。