

# 辣根过氧化物酶(HRP)检测试剂盒

(用于血清、血浆、细胞培养上清液和其它生物体内)

## 原理

辣根过氧化物酶分子量在 40kDa 左右, 是一种含亚铁血红素的蛋白质, 等电点 7.2; 易溶于水, 溶解度为 5%(W/V), 溶液呈棕红色, 透明; 也溶于 0.58 饱和度以下的硫酸铵溶液, 而 0.62 饱和度以上则不溶。该酶最适 PH 为 7.0(对愈创木酚为氢给体而言)。在室温下 HRP 在几周内保持稳定, 加热到 63℃后 15 分钟内稳定。过氧化物酶在生物界分布极广, 在细胞代谢的氧化还原过程中起重要的作用。

本实验采用比色法在酶标板上反应, 标准品和样品中的 HRP 与 TMB 底物工作液显色, 最后加终止液硫酸, 在 450nm 处测 OD 值, HRP 浓度与 OD 值成正比, 可通过绘制标准曲线求出标本中 HRP 浓度。

## 试剂盒组成 (2-8℃保存)

酶标板 (Coated Wells)	96孔	标准品 (Standards): 100ng/ml	0.5ml
底物工作液 (TMB Solution)	12ml	终止液 (Stop Solution)	12ml

## 准备试剂与收集血样

- 收集标本: 血清、血浆 (EDTA、柠檬酸盐、肝素抗凝)、尿液、细胞培养上清液、组织匀浆等尽早检测, 2-8℃保存 48 小时; 更长时间须冷冻 (-20℃或-70℃) 保存, 避免反复冻融。血清、血浆、细胞培养上清可能需用蒸馏水稀释, 请先做预实验, 以确定稀释倍数。
- 标准品液配制: 设标准管 8 管, 第一管加蒸馏水 950ul, 第二至第八管加入蒸馏水 500ul。在第一管中加入 100ng/ml 的标准品溶液 50ul 混匀后用加样器吸出 500ul, 移至第二管。如此反复作对倍稀释, 从第七管中吸出 500ul 弃去。第八管为空白对照。

## 检测程序

- 加样: 每孔各加入标准品或待测样品 20ul。
- 每孔加入底物工作液 100ul, 置 37℃暗处反应 15 分钟。
- 每孔加入 100ul 终止液混匀。
- 30 分钟内用酶标仪在 450nm 处测吸光值。

## 结果计算与判断

- 所有 OD 值都应减除空白值后再行计算。
- 以标准品 5000、2500、1250、625、312、156、78、0 pg/ml 为横坐标, OD 值为纵坐标, 在坐标纸上作图, 画出标准曲线。
- 根据样品 OD 值在该曲线图上查出相应 HRP 含量。1mg 的 HRP=250U 活性

## 试剂盒性能

- 灵敏度: 最小的 HRP 检测浓度小于 40pg/ml。
- 特异性: 可同时检测重组或天然的 HRP。不与其它细胞因子有交叉反应。
- 重复性: 板内、板间变异系数均小于 10%。

## 注意事项

- 以上标准孔及待测样品均建议做复孔, 每次测定应同时做标准曲线。
- 板条开封后剩余板条要再封好, 保持**板条干燥**。
- 本试剂盒宜置 4℃冰箱保存。
- 本试剂盒仅用于科研, 不能用于临床诊断!
- 样本如果浑浊需要离心或稀释后检测。