

## 辣根过氧化物酶 (300U/mg)

## Peroxidase

货号: P6782-1

储存条件: 2-8℃保存。有效期5年。

## 产品性质

---

溶解性	10 mg/mL in water
来源	From horseradish
别名	Donor: hydrogen-peroxide oxidoreductase; Horseradish peroxidase; HRP POD
英文名称	Peroxidase (POD)
CAS	9003-99-0
储存条件	-20℃
酶活/效价	233-300units/mg solid
外观(性状)	褐色结晶性冻干粉状
单位	支

---

说明: POD 是一种具有氧化还原酶性质的血红素蛋白。用于生化研究, 是酶标记法所用的一种主要酶。也用于生物液体中 葡萄糖和半乳糖的测定

HRP 是一种分子量达 44 000 的糖蛋白, 由无色的酶蛋白和深棕色的铁卟啉结合而成, 中性糖和氨基糖约占 18%, 主要有甘露糖、木糖、阿拉伯糖和己糖胺等。每一个 HRP 分子中含一个氯化血红素 IX 作辅基, 该辅基在 403nm 波长处有最大吸收峰, 而去辅基的酶蛋白在 275nm 波长处有最大吸收。HRP 在 403nm 的 OD 值与 275nm 的 OD 值之比, 也就是所谓的 RZ (Reinheits Zahl) 值。RZ 值仅说明血红素基团在 HRP 中的含量, 并非表示 HRP 制剂的真正纯度, 而且 RZ 值高的 HRP 制剂, 并不意味着酶活性也高。但可以一纯酶溶液在 10mm 光径 403nm 波长下的吸光度来计算酶浓度 [1% (W/V) 酶溶液吸光度为 22.5, 浓度为 227 $\mu$ mol/L]。纯 HRP 干燥贮存于 -20 $^{\circ}$ C 可保持稳定, 使用 1.36 mol/L 甘油、



10mmol/L 磷酸钠、30umol/L 牛血清白蛋白和 20umol/L 细胞色素 C (pH 7.4) 溶液作为基质冷冻保存, 可使酶结合物稳定数年。HRP 对热及有机溶剂的作用比较稳定, 用甲苯与石蜡切片处理或用纯乙醇或 10% 甲醛水溶液固定做冷冻切片, 均不能使其活性改变。氰化物或硫化物在  $10^{-5}$ ~ $10^{-6}$ mol/L 浓度时具有可逆性地抑制 HRP 的作用; 氟化物、叠氮化合物或羟胺仅在高于  $10^{-3}$ mol/L 浓度时抑制 HRP; HRP 还可被羟甲基过氧化氢不可逆地抑制。强酸也是 HRP 的强烈的抑制剂。

因此, 在酶免疫测定常选用上述的某些化合物如氟化钠、叠氮钠和强酸等作为酶反应的终止剂。此外, 在配制酶免疫测定的稀释缓冲液时, 为防止酶失活, 应避免使用叠氮钠作防腐剂。HRP 的同工酶主要可分为三种类型: ①含糖量高的酸性同工酶。②等电点接近于中性(或微碱)的含糖量相对较低的同工酶。③含糖量低的碱性( $PI > 11$ )同工酶。酶免疫试验中所使用的 HRP, 以  $PI$  为 8.7~9.0 的所谓“C”同工酶为主要组成成分, 其他同工酶的活性则很低。“C”同工酶的共价结构由 2 个密切接近的区域组成, 血红素基团则位于其间而成夹心结构, 糖链以 8 个不同的部位结合于多肽。天然的酶所带的纯电荷极少; 无游离的。一氨基, 仅有 2 个可测出的组氨酸, 6 个赖氨酸似乎全被糖链外壳所遮盖。因此, HRP 一般仅有 1~2 个可用于耦联的氨基。

根据 HRP 的催化特性, ELISA 中一般使用过氧化氢 ( $H_2O_2$ ) 作为 HRP 底物之一, 在供氢体(即色原底物)存在时, HRP 与  $H_2O_2$  的反应迅速而又专一。由图 4 可见, HRP 被  $H_2O_2$  二价地氧化形成复合物 I, 而复合物 I 又可与氢供体的二步连续的单价相互作用而还原至起始状态。复合物 II 是被氧化的带一个电子的中间产物, 当  $H_2O_2$  过量, 由于复合物 III 或 IV 的形成, 酶活性受抑制(以后补上)。30% 的  $H_2O_2$  并不稳定。由于  $H_2O_2$  既为 HRP 的底物, 也为其抑制剂, 因而 ELISA 要想得到满意的测定结果,  $H_2O_2$  必须限定在一定的浓度范围内, 终浓度通常为 2~6 mmol/L。然而在实际研究工作中, 一般很少注意这一点。大多数研究者所使用的  $H_2O_2$  的浓度常较理想反应所需的量大 2~4 倍。吸附于固相的 HRP 较游离的 HRP 更易受过量  $H_2O_2$  的抑制。如果 30%  $H_2O_2$  贮存液浓度经测定证实确为 30%, 则稀释 10 000—12 000 倍常是较为理想的底物。 $H_2O_2$  的摩尔消光系数为 10mm 光径 240nm 波长下为 43.6, 因此, 可通过这种方式来检测  $H_2O_2$  工作溶液的浓度。

固相 ELISA 中, 当温度高于 20°C 时, HRP 活性常较低, 在底物溶液中加入非离子去垢剂聚山梨醇-20 或 TritonX-100 可延迟 HRP 的失活, 且可使反应温度加大, 但非离子去垢剂的这种酶活性保护效应依氢供体的不同而有差异。如以 2,2'-联氮-双-[3-乙基苯并噻唑啉]-6-磺酸 (ABTS) 为氢供体, 则只能保护 20% 的酶活性, 而以邻联茴香胺 (ODA) 为氢供体时, 酶活性的保护提高至 90%。

HRP 之所以是迄今为止在 ELISA 中应用最为广泛的标记用酶, 主要是因为其一方面易于提取, 价格相对低廉; 另一方面性质稳定, 耐热及有机溶剂的作用, 与抗原或抗体偶联后, 活性很少受损失。

## 注意事项

为了您的安全和健康, 请穿实验服并戴一次性手套操作。

本产品仅作科研用途!

