

过氧化物酶(Peroxidase, POD)试剂盒说明书

(微板法 196 样)

一、产品简介:

过氧化物酶 (POD, EC 1.11.1.7) 广泛存在于动物、植物、微生物和培养细胞中, 是普遍存在的一种重要的氧化还原酶, 其活性高低与抗性密切相关。在过氧化物酶催化下, H_2O_2 氧化愈创木酚生成红棕色产物, 该产物在 470nm 处有最大光吸收, 故可通过测 470nm 下吸光值变化测定过氧化物酶活性。

二、试剂盒组分与配制

试剂名称	规格	保存要求	备注
提取液	液体 110mL×1 瓶	4℃保存	用前摇匀, 且用蒸馏水稀释一倍后再使用。
试剂一	液体 10mL×1 瓶	4℃保存	
试剂二	液体 50mL×1 瓶	4℃保存	
试剂三	液体 2mL×1 瓶	4℃保存	

三、所需的仪器和用品:

酶标仪、96 孔板、台式离心机、可调式移液器、研钵、冰和蒸馏水。

四、过氧化物酶 (POD) 的测定:

建议正式实验前选取 2 个样本做预测定, 了解本批样品情况, 熟悉实验流程, 避免实验样本和试剂浪费!

1、样本制备:

- ① 组织样本: 称取约 0.1g 组织 (水分充足的样本可取 0.25g), 加入 1mL 提取液, 进行冰浴匀浆。4℃×12000rpm 离心 10min, 取上清, 置冰上待测。

【注】: 若增加样本量, 可按照组织质量 (g): 提取液体积(mL)为 1: 5~10 的比例进行提取。

- ② 细菌/细胞样本:

先收集细菌或细胞到离心管内, 离心后弃上清; 取约 500 万细菌或细胞加入 1mL 提取液, 超声波破碎细菌或细胞 (冰浴, 功率 200W, 超声 3s, 间隔 10s, 重复 30 次); 12000rpm 4℃离心 10min, 取上清, 置冰上待测。

【注】: 若增加样本量, 可按照细菌/细胞数量 (10^4): 提取液 (mL) 为 500~1000: 1 的比例进行提取。

- ③ 液体样本: 直接检测; 若浑浊, 离心后取上清检测。

2、上机检测:

- ① 酶标仪预热 30min 以上, 调节波长至 470nm。
- ② 测定前将试剂一、二和三解冻至室温 (25℃)。
- ③ 在 96 孔板中依次加入:

试剂名称 (μL)	测定管
样本	10
试剂一	40
试剂二	140
试剂三	10
混匀, 立即在 470nm 处读取吸光值 A1, 1 分钟后读取 A2, $\Delta A=A2-A1$ 。	

五、结果计算：

1、按样本鲜重计算：

酶活定义:每克组织每分钟在反应体系中使 470nm 处吸光值增加 1 为一个酶活单位 U。

$$\text{POD}(\Delta\text{OD}_{470}/\text{min/g 鲜重})=\Delta A\div(W\times V1\div V)\div 1\div T\times D=100\times\Delta A\div W\times D$$

2、按样本蛋白浓度计算：

酶活定义:每毫克组织蛋白每分钟在反应体系中使 470nm 处吸光值增加 1 为一个酶活单位 U。

$$\text{POD}(\Delta\text{OD}_{470}/\text{min/mg prot})=\Delta A\div(V1\times\text{Cpr})\div 1\div T\times D=100\times\Delta A\div\text{Cpr}\times D$$

3、按细胞数量计算：

酶活定义:每 10^4 个细胞每分钟在反应体系中使 470nm 处吸光值 1 为一个酶活单位 U。

$$\text{POD}(\Delta\text{OD}_{470}/\text{min}/10^4\text{cell})=\Delta A\div(500\times V1\div V)\div 1\div T\times D=0.2\times\Delta A\times D$$

4、按液体体积计算：

酶活定义:每毫升液体每分钟在反应体系中使 470nm 处吸光值增加 1 为一个酶活单位 U。

$$\text{POD}(\Delta\text{OD}_{470}/\text{min/mL})=\Delta A\div V1\div 1\div T\times D=100\times\Delta A\times D$$

V---加入提取液体积，1 mL； V1---加入样本体积，0.01mL；

T---反应时间，1 min； W---样本质量，g；

500---细胞数量，万； D---稀释倍数，未稀释即为 1；

Cpr---样本蛋白质浓度，mg/mL； 建议使用本公司的 BCA 蛋白含量测定试剂盒。