

过氧化物酶(POD)活性检测试剂盒说明书

注意：正式测定之前选择 2-3 个预期差异大的样本做预测定。

规格：100T/96S

微量法

产品内容：

- 提取液：液体 100mL×1 瓶，4℃ 保存；
- 试剂一：液体 20mL×1 瓶，4℃ 保存；
- 试剂二：液体 0.2mL×1 瓶，4℃ 保存；用时加入 3mL 试剂一，现配现用，可 4℃ 保存一周；
- 试剂三：液体 3 mL×1 瓶，4℃ 保存。

产品说明：

POD（EC 1.11.1.7）广泛存在于动物、植物、微生物中，可催化过氧化氢氧化酚类和胺类化合物，具有消除过氧化氢和酚类、胺类毒性的双重作用。POD 在有过氧化氢存在的情况下，能使愈创木酚发生氧化，生成茶褐色物质，该物质在 470nm 有最大光吸收。

需自备的仪器和用品：

可见分光光度计/酶标仪、台式离心机、可调式移液器、微量玻璃比色皿/96 孔板、研钵、冰和蒸馏水

操作步骤：

一、粗酶液提取：

1、细菌、细胞或组织样品的制备

收集细菌或细胞到离心管内，离心后弃上清；按照每 500 万细菌或细胞加入 1mL 提取液，超声波破碎细菌或细胞（功率 20%，超声 3s，间隔 10s，重复 30 次）；8000g 4℃离心 10min，取上清，置冰上待测。

称取约 0.1g 组织，加入 1mL 提取液进行冰浴匀浆；8000g 4℃离心 10min，取上清，置冰上待测。

2、血清（浆）样品：直接检测。

二、测定步骤：

- 1、 分光光度计或酶标仪预热 30min 以上，调节波长至 470nm，蒸馏水调零。
- 2、 测定前将试剂一、二和三在 37℃（哺乳动物）或 25℃（其它物种）放置 10min 以上。
- 3、 样本测定表

试剂名称（μL）	测定管
试剂一	120
试剂二	30
试剂三	30
蒸馏水	60
样本	5

在 EP 管中按顺序加入上述试剂，立即混匀并计时，立即取 200 μ L 转移至微量玻璃比色皿或 96 孔板中，记录 470nm 下 30s 时的吸光值 A1 和 1min30s 后的吸光值 A2。计算 $\Delta A = A2 - A1$ 。

POD 活性计算：

用微量玻璃比色皿测定的计算公式如下

1、按血清（浆）体积计算

单位定义：每 mL 血清（浆）在每 mL 反应体系中每分钟 A470 变化 0.01 定义为一个酶活力单位。

$$\text{POD (U/mL)} = \Delta A \div 0.01 \times V_{\text{反总}} \div V_{\text{样}} \div T = 4900 \times \Delta A$$

2、按样本蛋白浓度计算

单位定义：每 mg 组织蛋白在每 mL 反应体系中每分钟 A470 变化 0.01 定义为一个酶活力单位。

$$\text{POD (U/mg prot)} = \Delta A \div 0.01 \times V_{\text{反总}} \div (C_{\text{pr}} \times V_{\text{样}}) \div T = 4900 \times \Delta A \div C_{\text{pr}}$$

3、按样本鲜重计算

单位定义：每 g 组织在每 mL 反应体系中每分钟 A470 变化 0.01 定义为一个酶活力单位。

$$\text{POD (U/g 鲜重)} = \Delta A \div 0.01 \times V_{\text{反总}} \div (W \div V_{\text{样总}} \times V_{\text{样}}) \div T = 4900 \times \Delta A \div W$$

4、按细菌或细胞数量计算

单位定义：每 1 万个细菌或细胞在每 mL 反应体系中每分钟 A470 变化 0.01 定义为一个酶活力单位。

$$\text{POD (U/10}^4 \text{ cell)} = \Delta A \div 0.01 \times V_{\text{反总}} \div (500 \div V_{\text{样总}} \times V_{\text{样}}) \div T = 9.8 \times \Delta A$$

用 96 孔板测定的计算公式如下

1、按血清（浆）体积计算

单位定义：每 mL 血清（浆）在每 mL 反应体系中每分钟 A470 变化 0.005 定义为一个酶活力单位。

$$\text{POD (U/mL)} = \Delta A \div 0.005 \times V_{\text{反总}} \div V_{\text{样}} \div T = 9800 \times \Delta A$$

2、按样本蛋白浓度计算

单位定义：每 mg 组织蛋白在每 mL 反应体系中每分钟 A470 变化 0.005 定义为一个酶活力单位。

$$\text{POD (U/mg prot)} = \Delta A \div 0.005 \times V_{\text{反总}} \div (C_{\text{pr}} \times V_{\text{样}}) \div T = 9800 \times \Delta A \div C_{\text{pr}}$$

3、按样本鲜重计算

单位定义：每 g 组织在每 mL 反应体系中每分钟 A470 变化 0.005 定义为一个酶活力单位。

$$\text{POD (U/g 鲜重)} = \Delta A \div 0.005 \times V_{\text{反总}} \div (W \div V_{\text{样总}} \times V_{\text{样}}) \div T = 9800 \times \Delta A \div W$$

4、按细菌或细胞数量计算

单位定义：每 1 万个细菌或细胞在每 mL 反应体系中每分钟 A470 变化 0.005 定义为一个酶活力单位。

$$\text{POD (U/10}^4 \text{ cell)} = \Delta A \div 0.005 \times V_{\text{反总}} \div (500 \div V_{\text{样总}} \times V_{\text{样}}) \div T = 19.6 \times \Delta A$$

V 反总：反应体系总体积，0.245mL；V 样：加入样本体积，0.005mL；V 样总：加入提取液体积，1 mL；T：反应时间，1 min；Cpr：样本蛋白质浓度，mg/mL；W：样本鲜重，g；500：细菌或细胞总数，500 万。

注意事项：

- 1、如一次测定的样本数量较多，可将试剂一、二、三和蒸馏水按照比例混合，在 37℃（哺乳动物）或 25℃（其它物种）放置 10min，测定时加入 240 μ L 即可。
- 2、样本测定值如果小于 0.005，可将反应时间延长到 3-5 分钟，计算时除以反应时间即可；如果高于 0.5，可将样本用提取液进行稀释。计算时乘以相应的稀释倍数即可。