

过氧化物酶(Peroxidase, POD)试剂盒说明书

(微板法 96 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
提取液	液体 110mL×1 瓶	4°C保存
试剂一	液体 5mL×1 瓶	4°C保存
试剂二	液体 30mL×1 瓶	4°C保存
试剂三	液体 1mL×1 支	4°C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°C×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°C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°C)。

③ 在 96 孔板中依次加入:

试剂名称 (μ L)	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, $\Delta A=A_2-A_1$ 。	

【注】: 1. 该反应很迅速, 加完试剂三即启动反应, 所以试剂三加完需立即检测, 若 A1 值大于 0.6 或 A2 值大于 1.5 或 ΔA 大于 1, 可降低样本量 V1 (如减至 5 μ L, 则试剂二相应增加), 或对样本上清液

用蒸馏水稀释成合适的稀释倍数后再加样测定,则改变后 V1 或稀释倍数 D 需代入公式重新计算。

2. 若 ΔA 小于 0.005, 可增加样本量 V1 (如增至 20 μ L, 则试剂二相应减少), 或可延长反应时间 T (如延长到 5min 后读取 A2), 则改变后的 V1 和 T 需代入公式重新计算。
3. 若上升趋势不稳定, 可全部加完稳定几分钟后再次读取 A1, 选取一段线性增长范围读取 A2。
4. 若检测体系不变, 可按照样本检测数量, 预先把试剂一和二和三按照 40:140:10 比例配成所需体积的混合液, 在加样表中直接加一枪 190 μ L 混合液即可。

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。

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

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。

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

3、按细胞数量计算:

酶活定义:每 10⁴ 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。

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

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。