

## 过氧化物酶(Peroxidase, POD)试剂盒说明书

(分光法 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 20mL×1 瓶	4°C保存
试剂二	液体 90mL×1 瓶	4°C保存
试剂三	液体 4mL×1 瓶	4°C保存

### 三、所需的仪器和用品:

可见分光光度计、1mL 玻璃比色皿 (光径 1cm)、台式离心机、可调式移液器、研钵

### 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 可见分光光度计预热 30min 以上, 调节波长至 470nm, 蒸馏水调零。  
② 测定前将试剂一、二和三解冻至室温 (25°C)。  
③ 在 1mL 玻璃比色皿 (光径 1cm) 中依次加入:

试剂名称 ( $\mu$ L)	测定管
样本	40
试剂一	160
试剂二	560
试剂三	40
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 1 或  $\Delta A$  大于 1, 可降低样本量 V1 (如减至 20 $\mu$ 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  $\Delta A$  小于 0.005，可增加样本量 V1（如增至 80 $\mu$ 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，预先将试剂一和二和三按照 160:560:40 比例配成所需体积的混合液，在加样表中直接加一枪 760 $\mu$ 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 0.5 为一个酶活力单位 U。

$$\text{POD}(\Delta\text{OD}_{470}/\text{min/g 鲜重}) = \Delta A \div (W \times V1 \div V) \div 0.5 \div T \times D = 50 \times \Delta A \div W \times D$$

### 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 0.5 为一个酶活力单位 U。

$$\text{POD}(\Delta\text{OD}_{470}/\text{min/mg prot}) = \Delta A \div (V1 \times \text{Cpr}) \div 0.5 \div T \times D = 50 \times \Delta A \div \text{Cpr} \times D$$

### 3、按细胞数量计算：

酶活定义：每 10<sup>4</sup> 个细胞每分钟在反应体系中使 470nm 处吸光值 0.5 为一个酶活力单位 U。

$$\text{POD}(\Delta\text{OD}_{470}/\text{min}/10^4\text{cell}) = \Delta A \div (500 \times V1 \div V) \div 0.5 \div T \times D = 0.1 \times \Delta A \times D$$

### 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 0.5 为一个酶活力单位 U。

$$\text{POD}(\Delta\text{OD}_{470}/\text{min/mL}) = \Delta A \div V1 \div 0.5 \div T \times D = 50 \times \Delta A \times D$$

V---加入提取液体积，1 mL；

V1---加入样本体积，0.04mL；

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。