

过氧化物酶(Peroxidase, POD)试剂盒说明书

微量法 100管/96样

正式测定前务必取2-3个预期差异较大的样本做预测定

测定意义：

POD (EC 1.11.1.7) 广泛存在于动物、植物、微生物和培养细胞中，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。

测定原理：

POD催化H₂O₂氧化特定底物，在470nm有特征光吸收。

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、微量石英比色皿/96孔板、研钵、冰和蒸馏水

试剂的组成：

提取液：液体100mL×1瓶，4℃保存；

试剂一：液体25mL×1瓶，4℃保存；

试剂二：液体100μL×1支，4℃保存；

试剂三：液体100μL×1支，4℃保存。

粗酶液提取：

1、细菌、细胞或组织样品的制备：

细菌或培养细胞：先收集细菌或细胞到离心管内，离心后弃上清；按照细菌或细胞数量（10⁴个）：提取液体积（mL）为500~1000：1的比例（建议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20%或200W，超声3s，间隔10s，重复30次）；8000g 4℃离心10min，取上清，置冰上待测。

组织：按照组织质量（g）：提取液体积(mL)为1：5~10的比例（建议称取约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。

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. 工作液的配制：临用前将试剂一、试剂二、试剂三按照2.6（mL）：1.5（μL）：1（μL）的比例混匀；在37℃（哺乳动物）或25℃（其它物种）预热10min以上；现配现用。
3. 在微量石英比色皿或96孔板中加入10μL样本和190μL工作液，混匀，记录470nm下1min时吸光值A1和2min后的吸光值A2。计算 $\Delta A = A_2 - A_1$ 。

注意：

如果 ΔA 小于0.005，可将反应时间延长到5min。如果 ΔA 大于0.5，可将样本用提取液稀释后测定，计算公式中乘以相应稀释倍数。

POD活性计算：

用微量石英比色皿测定的计算公式如下

1、血清（浆）POD活性

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为一个酶活力单位。

计算公式：

$$\text{POD (U/mL)} = \Delta A \times V_{\text{反总}} \div V_{\text{样}} \div 0.01 \div T = 2000 \times \Delta A$$

2、组织、细菌或细胞POD活性

(1) 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为一个酶活力单位。

$$\text{POD (U/mg prot)} = \Delta A \times V_{\text{反总}} \div (V_{\text{样}} \times \text{Cpr}) \div 0.01 \div T = 2000 \times \Delta A \div \text{Cpr}$$

(2) 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为一个酶活力单位。

$$\text{POD (U/g 鲜重)} = \Delta A \times V_{\text{反总}} \div (W \times V_{\text{样}} \div V_{\text{样总}}) \div 0.01 \div T = 2000 \times \Delta A \div W$$

(3) 按细菌或细胞密度计算

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为一个酶活力单位。

$$\text{POD (U/104 cell)} = \Delta A \times V_{\text{反总}} \div (500 \times V_{\text{样}} \div V_{\text{样总}}) \div 0.01 \div T = 4 \times \Delta A$$

V反总：反应体系总体积，0.2mL； V样：加入样本体积，0.01mL； 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：样本质量； 500：细菌或细胞总数，500万。

用96孔板测定的计算公式如下

1、血清（浆）POD活性

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为一个酶活力单位。

$$\text{POD (U/mL)} = \Delta A \times V_{\text{反总}} \div V_{\text{样}} \div 0.005 \div T = 4000 \times \Delta A$$

2、组织、细菌或细胞POD活性

(1) 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为一个酶活力单位。

$$\text{POD (U/mg prot)} = \Delta A \times V_{\text{反总}} \div (V_{\text{样}} \times \text{Cpr}) \div 0.005 \div T = 4000 \times \Delta A \div \text{Cpr}$$

(2) 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为一个酶活力单位。

$$\text{POD (U/g 鲜重)} = \Delta A \times V_{\text{反总}} \div (W \times V_{\text{样}} \div V_{\text{样总}}) \div 0.005 \div T = 4000 \times \Delta A \div W$$

(3) 按细菌或细胞密度计算

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为一个酶活力单位。

$$\text{POD (U/104 cell)} = \Delta A \times V_{\text{反总}} \div (500 \times V_{\text{样}} \div V_{\text{样总}}) \div 0.005 \div T = 8 \times \Delta A$$

V反总：反应体系总体积，0.2mL； V样：加入样本体积，0.01mL； 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：样本质量； 500：细菌或细胞总数，500万。