

过氧化物酶(POD)检测试剂盒说明书

微量法

AM0091

保存条件

按照产品内容保存要求保存。

产品信息

产品名称	产品货号	规格
过氧化物酶(POD)检测试剂盒 微量法	AM0091	100 管/96 样

产品简介

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 H_2O_2 氧化特定底物, 在 470nm 有特征光吸收。

产品内容

组成	含量	保存
提取液	100mLx1 瓶	4°C
试剂一	20mLx1 瓶	4°C
试剂二	液体 x1 瓶	4°C 用时加入 3mL 试剂一充分溶解待用; 用不完的试剂 4°C 保存
试剂三	液体 3mLx1 瓶	4°C

使用方法

正式测定前务必取 2-3 个预期差异较大的样本做预测定

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

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 (10^4 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、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)	测定孔
样本	10
蒸馏水	60
试剂一	120
试剂二	30
试剂三	30

在微量石英比色皿或 96 孔板中按顺序加入上述试剂, 立即混匀并计时, 记录 470nm 下 30s 时的吸光值 A1 和 1min30s 后的吸光值 A2。计算 $\Delta A = A2 - A1$ 。

注意:

1、若一次性测定样本较多, 可将试剂一、二、三和蒸馏水按比例配成混合液, 在 37℃ (哺乳动物) 或 25℃ (其它物种) 放置 10min 以上, 测定时加入 10μL 样本和 240μL 混合液测定。

2、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：POD (U/mL) = $\Delta A \times V_{\text{反总}} \div V_{\text{样}} \div 0.01 \div T = 2500 \times \Delta A$

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。

POD (U/mg prot) = $\Delta A \times V_{\text{反总}} \div (V_{\text{样}} \times C_{\text{pr}}) \div 0.01 \div T = 2500 \times \Delta A \div C_{\text{pr}}$

(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。

POD (U/g 鲜重) = $\Delta A \times V_{\text{反总}} \div (W \times V_{\text{样}} \div V_{\text{样总}}) \div 0.01 \div T = 2500 \times \Delta A \div W$

(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。

POD (U/10⁴ cell) = $\Delta A \times V_{\text{反总}} \div (500 \times V_{\text{样}} \div V_{\text{样总}}) \div 0.01 \div T = 5 \times \Delta A$

V 反总：反应体系总体积，0.25mL； 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。

POD (U/mL) = $\Delta A \times V_{\text{反总}} \div V_{\text{样}} \div 0.005 \div T = 5000 \times \Delta A$

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。

$$\text{POD (U/mg prot)} = \Delta A \times V_{\text{反总}} \div (V_{\text{样}} \times \text{Cpr}) \div 0.005 \div T = 5000 \times \Delta A \div \text{Cpr}$$

(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。

$$\text{POD (U/g 鲜重)} = \Delta A \times V_{\text{反总}} \div (W \times V_{\text{样}} \div V_{\text{样总}}) \div 0.005 \div T = 5000 \times \Delta A \div W$$

(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。

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

V 反总：反应体系总体积，0.25mL； 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。