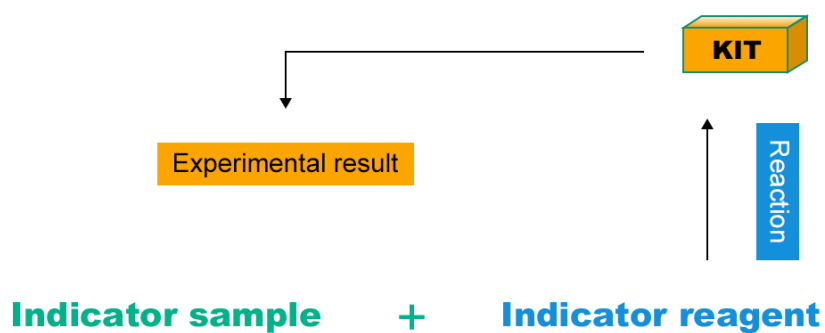


上海茁彩生物科技有限公司
ZCIBIO Technology Co., Ltd



生化检测原理示意图

Cat. NO: ZC-S0352

Size: 100T/96S

过氧化物酶 (POD) 检测试剂盒说明书

微量法

*正式测定前务必取 2-3 个预期差异较大的样本做预测定

一、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。

二、测定原理:

POD 催化 H₂O₂ 氧化特定底物, 在 470nm 有特征光吸收。

三、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

四、试剂的组成和配置:

种类	试剂规格	储存条件	使用方法及注意事项
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 100 μL×1 支	4℃保存	
试剂三	液体 100 μL×1 支	4℃保存	

五、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。

六、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（ μ L）：1（ μ L）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 10 μ L 样本和 190 μ L 工作液，混匀，记录 470nm 下 1min 时吸光值 A1 和 2min 时的吸光值 A2（A2 和 A1 的时间间隔为 1min）。计算 $\Delta A = A2 - A1$ 。

注意：

1. 建议取 2-3 个样本做个预测定，样本和工作液混匀后很快由橘黄色变成红褐色，A1 值会很大（ >1 ），且可能 A2-A1 出现负值，说明酶活性比较高，可将样本的提取上清液用提取液或蒸馏水稀释 10-20 倍后重新检测，10ul 上清液+90ul 提取液或蒸馏水为稀释 10 倍。计算结果乘以相应的稀释倍数。

2. 如果 A1 值很小（ <0.1 ），且 ΔA 很小（ <0.005 ），且样本和工作液混匀后一段时间没有显色，说明酶活性很低，可以延长反应时间到 10min、20min 或 30min，计算公式代入实际反应时间。

3. 由于样本本身的问题，不同物种的 POD 差异很大，有的物种活性很高（加入工作液后很快变成了红褐色）；有的物种活性很低（加入工作液后 5 分钟内不变色），吸光值只有小数点后三位的变化。

七、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。

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

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。

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

(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 0.005 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。

$$\text{POD (U/10}^4 \text{ cell)} = \Delta A \times V_{\text{反总}} \div (500 \times V_{\text{样}} \div V_{\text{样总}}) \div 0.005 \div T = 8 \times \Delta A$$

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。