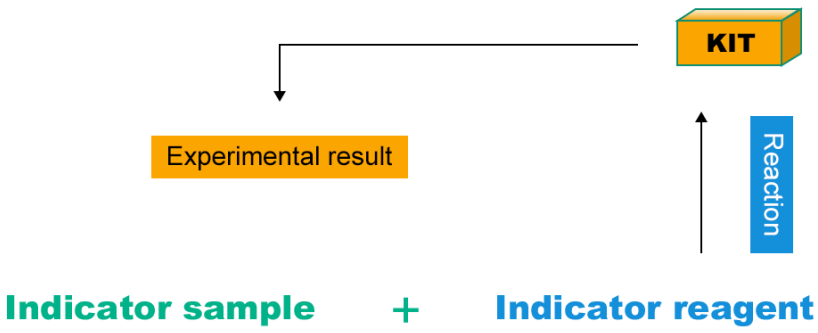
上海茁彩生物科技有限公司

ZCIBIO Technology Co.,Ltd



生化检测原理示意图

Cat. NO：ZC-S0625 Size：50T/48S

过氧化物酶（POD）检测试剂盒说明书

分光光度法

***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、台式离心机、可调式移液器、1mL 玻璃比色皿、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 60mL×1 瓶	4℃保存	-
试剂一	液体 50mL×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	-

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、测定步骤和加样表：

1.分光光度计预热 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 1mL 玻璃比色皿中加入 50μL 样本和 950μL 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ΔA =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：

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）=ΔA×V 反总÷V 样÷0.01÷T =2000×ΔA

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）=ΔA×V 反总÷（V 样×Cpr）÷0.01÷T =2000×ΔA÷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。

POD（U/g 鲜重）=ΔA×V 反总÷(W× V 样÷V 样总)÷0.01÷T =2000×ΔA÷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/10^4 cell）=ΔA×V 反总÷(500×V 样÷V 样总)÷0.01÷T =4×ΔA

V 反总：反应体系总体积，1mL； V 样：加入样本体积，0.05mL；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。