

上海茁彩生物科技有限公司
Shanghai zcibio technology Co., Ltd.



生化检测原理示意图

过氧化物酶(Peroxidase, POD)试剂盒说明书

可见分光光度法

正式测定前务必取2-3个预期差异较大的样本做预测定

试剂的组成：

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 60mL×1 瓶	4℃保存	-
试剂二	0.33mL液体×2 瓶	4℃保存	用时每瓶加入 5mL 试剂一；用不完的试剂 4℃保存一周；
试剂三	液体 10 mL×1 瓶	4℃保存	-

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。POD 催化 H_2O_2 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、台式离心机、可调式移液器、1mL 玻璃比色皿、研钵、冰和蒸馏水

操作步骤：

一、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。

试剂名称 (μL)	测定孔
样本	15
蒸馏水	270
试剂一	520
试剂二	130
试剂三	135

测定前将试剂一、二和三 37°C (哺乳动物) 或 25°C (其它物种) 放置 10min。在 1mL 玻璃比色皿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°C (哺乳动物) 或 25°C (其它物种) 放置 10min 以上, 测定时加入 15 μ L 样本和 1055 μ L 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。

三、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: $POD (U/mL) = \Delta A \times V_{反总} \div V_{样} \div 0.01 \div T = 7133 \times \Delta A$

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。

$POD (U/mg \text{ prot}) = \Delta A \times V_{反总} \div (V_{样} \times C_{pr}) \div 0.01 \div T = 7133 \times \Delta A \div C_{pr}$

(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。

$POD (U/g \text{ 鲜重}) = \Delta A \times V_{反总} \div (W \times V_{样} \div V_{样总}) \div 0.01 \div T = 7133 \times \Delta A \div W$

(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。

$POD (U/10^4 \text{ cell}) = \Delta A \times V_{反总} \div (500 \times V_{样} \div V_{样总}) \div 0.01 \div T = 14.27 \times \Delta A$

V 反总: 反应体系总体积, 1.07mL; V 样: 加入样本体积, 0.015mL; 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。