过氧化物酶(Peroxidase，POD)试剂盒说明书

分光法 48 样

一、产品说明

过氧化物酶（POD）是广泛存在于各种动物、植物和微生物体内的一类氧化酶，具有消除过氧化氢和酚类胺类毒性的双重作用。 POD 是植物在逆境条件下酶促防御系统的关键酶之一，与超氧化物歧化酶(SOD)、过氧化氢酶(CAT)协同作用，清除体内过剩的自由基，从而提高植物的抗逆性。

POD 催化 H_2O_2 氧化特定底物，在 470nm 有特征光吸收。

二、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

三、试剂的组成：

试剂名称	规格	保存温度	备注
提取液	液体 60mL×1 瓶	4℃保存	工作液的配置：临用前将试剂一：试剂二：试剂三按照 2.6（mL）:1.5（μL）:1（μL）现用现配，用多少配多少并平衡至室温。
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	

备注：试剂二具有刺激性，做实验时需做好防护措施。

四、样本制备

建议正式实验前取 2 个样本做预测定，了解本批样本含量情况，熟悉实验流程，避免实验样本和试剂浪费！

①组织样本：称取约 0.1g 样本加入 1ml 提取液，进行冰浴匀浆。 4℃，12000rpm 离心 10min，取上清置冰上待测。

②细菌/细胞样本： 先收集细菌/细胞到离心管内，离心后弃上清；取 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）， 12000rpm，4℃离心 10min，取上清，置冰上待测。

③液体样本：直接检测

五、POD 酶活性测定

1.分光光度计预热 30min，调节波长到 470nm，蒸馏水调零。

2.在玻璃比色皿中加入下列试剂：

试剂名称（μL）	测定管
上清液	50
工作液	950
在玻璃比色皿中混匀（用枪吹打）记录10s 的吸光值 A1 和 1min10s 的吸光值 A2,并计算△A=A2-A1。	

备注：如果反应液的颜色变化很明显或者 10s 时吸光值大于 1，△A 大于 0.5 可以将上清液稀释 10 倍后检测；如果△A 小于 0.005，可以延长反应时间，计算时除以实际的反应时间；或者将样本浓缩，建议取 0.2g 样本加入 1ml 提取液。

六、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 1 为一个酶活力单位。

计算公式：

POD（U/mL）=ΔA×V1÷V2÷1÷T =20×ΔA×稀释倍数

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 1 为一个酶活力单位。

POD（U/mg prot）＝ΔA×V1÷（V2×Cpr）÷1÷T =20×ΔA÷Cpr×稀释倍数

（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 1 为一个酶活力单位。

POD（U/g 鲜重）＝ΔA×V1÷(W× V2÷V3)÷1÷T =20×ΔA÷W×稀释倍数

（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 1 为一个酶活力单位。

POD（U/10^4 cell）＝ΔA×V1÷(500×V2÷V3)÷1÷T =0.04×ΔA×稀释倍数

V1：反应体系总体积，1mL；V2：加入样本体积，0.05mL；V3：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。稀释倍数：样本如有稀释乘以相应的稀释倍数，如没有则不乘。

七、参考文献

[1] Reuveni R . Peroxidase Activity as a Biochemical Marker for Resistance of Muskmelon (Cucumis melo) to Pseudoperonospora cubensis[J]. Phytopathology, 1992, 82(7).

[2] Doerge D R , Divi R L , Churchwell M I . Identification of the Colored Guaiacol Oxidation Product Produced by Peroxidases[J]. Analytical Biochemistry, 1997, 250(1):10-17.

