北京沃凯生物科技有限公司
全国免费电话:400-819-385
www.bjoka-vip.com
Tel:010-62971590. Fax:62340519
M-ail:postmaster@oka-vip.com

过氧化物酶（POD）活性检测试剂盒说明书

微量法

注意：本产品试剂有所变动，请注意并严格按照该说明书操作。

货号：D17653

规格：100T/96S

产品组成：使用前请认真核对试剂体积与瓶内体积是否一致，有疑问请及时联系我们工作人员。

试剂名称	规格	保存条件
提取液	液体 110 mL×1 瓶	2-8℃保存
试剂一	液体 20 mL×1 瓶	2-8℃保存
试剂二	液体 0.04 mL×1 瓶	2-8℃保存
试剂三	液体 3 mL×1 瓶	2-8℃保存

溶液的配制：

1、 试剂二：液体置于试剂瓶内 EP 管中，使用前需先离心。

2、 试剂二工作液：取 0.01mL 试剂二加入 3.2 mL 试剂一混合备用（约 106T），现配现用，也可根据样本量按比例配制。

产品说明：

POD（EC 1.11.1.7）广泛存在于动物、植物、微生物中，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 在有过氧化氢存在的情况下，能使愈创木酚发生氧化，生成茶褐色物质，该物质在 470nm 有最大光吸收。

注意：实验之前建议选择 2-3 个预期差异大的样本做预实验。如果样本吸光值不在测量范围内建议稀释或者增加样本量进行检测。

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、微量玻璃比色皿/96 孔板、研钵/匀浆器、冰和蒸馏水。

操作步骤：

一、样本处理（可适当调整待测样本量，具体比例可以参考文献）

1、细菌、细胞或组织样本的制备

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 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）样本：直接检测。

二、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、试剂二工作液和试剂三在 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）	测定管
试剂一	120
试剂二工作液	30
试剂三	30
蒸馏水	60
样本	5

在 EP 管中按顺序加入上述试剂，立即混匀并计时，立即取 200μL 转移至微量玻璃比色皿或 96 孔板中，记录 470nm 下 30s 时的吸光值 A1 和 1min30s 后的吸光值 A2。计算 ΔA=A2-A1。

三、POD 活性计算

a、用微量玻璃比色皿测定的计算公式如下

1、按血清（浆）体积计算

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 定义为一个酶活力单位。

POD 活性（U/mL）=ΔA÷0.01×V 反总÷V 样÷T =4900×ΔA

2、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 定义为一个酶活力单位。

POD 活性（U/mg prot）=ΔA÷0.01×V 反总÷（Cpr×V 样）÷T =4900×ΔA÷Cpr

3、按样本质量计算

单位定义：每 g 组织在每 mL 反应体系中每分钟 A470 变化 0.01 定义为一个酶活力单位。

POD 活性（U/g 质量）=ΔA÷0.01×V 反总÷（W÷V 样总×V 样）÷T =4900×ΔA÷W

4、按细菌或细胞数量计算

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 定义为一个酶活力单位。

POD 活性（U/10^4 cell）=ΔA÷0.01×V 反总÷（500÷V 样总×V 样）÷T =9.8×ΔA

b、用 96 孔板测定的计算公式如下

1、按血清（浆）体积计算

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 定义为一个酶活力单位。

POD 活性（U/mL）=ΔA÷0.005×V 反总÷V 样÷T =9800×ΔA

2、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 定义为一个酶活力单位。

POD 活性（U/mg prot）=ΔA÷0.005×V 反总÷（Cpr×V 样）÷T =9800×ΔA÷Cpr

3、按样本质量计算

单位定义：每 g 组织在每 mL 反应体系中每分钟 A470 变化 0.005 定义为一个酶活力单位。

POD 活性（U/g 质量）=ΔA÷0.005×V 反总÷（W÷V 样总×V 样）÷T =9800×ΔA÷W

4、按细菌或细胞数量计算

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 定义为一个酶活力单位。

POD 活性（U/10^4 cell）=ΔA÷0.005×V 反总÷（500÷V 样总×V 样）÷T =19.6×ΔA

V 反总：反应体系总体积，0.245mL；V 样：加入样本体积，0.005mL；V 样总：加入提取液体积，1mL；T：反应时间，1min；Cpr：样本蛋白质浓度，mg/mL；W：样本质量，g；500：细菌或细胞总数，500 万。

注意事项：

1、 如一次测定的样本数量较多，试剂一、试剂二工作液、试剂三和蒸馏水按照比例混合，在 37℃（哺乳动物）或 25℃（其它物种）放置 10min，测定时加入 240μL 即可。

2、 样本测定值如果小于 0.005，可将反应时间延长到 3-5 分钟，计算时除以反应时间即可；如果高于 0.8 或者反应液中有较多气泡产生，可将样本用提取液进行稀释。计算时乘以相应的稀释倍数即可。

实验实例：

1、 取 0.1043g 大鼠心脏加入 1mL 提取液进行冰浴匀浆。8000g，4℃离心 10min，取上清置冰上，用提取液稀释 2 倍后按照测定步骤操作，用微量玻璃比色皿测定并计算 ΔA=A2-A1=0.6257-0.2351=0.3906。按样本质量计算含量得：

POD 活性（U/g 质量）=4900×ΔA÷W×2（稀释倍数）=3.67×10^4 U/g 质量。

2、 取 0.1049g 黄杨叶片，加入 1mL 提取液进行冰浴匀浆。8000g，4℃离心 10min，取上清置冰上，按照测定步骤操作，用微量玻璃比色皿测定并计算 ΔA=A2-A1=0.8512-0.1313=0.7199。按样本质量计算含量得：

POD 活性（U/g 质量）=4900×ΔA÷W=3.363×10^4 U/g 质量

相关发表文献：

[1] Yin Y J, Chen C J, Guo S W, et al. The fight against Panax notoginseng root-rot disease using zingiberaceae essential oils as potential weapons[J]. Frontiers in plant science, 2018, 9: 1346.

[2] Dou S, Liu S, Xu X, et al. Octanal inhibits spore germination of Penicillium digitatum involving membrane peroxidation[J]. Protoplasma, 2017, 254(4): 1539-1545.

[3] Li B, Ding Y, Tang X, et al. Effect of L-Arginine on Maintaining Storage Quality of the White Button Mushroom (Agaricus bisporus) [J]. Food and Bioprocess Technology, 2019, 12(4): 563-574.

[4] Yanan Wang,Chengzhen Liang,Zhigang Meng,et al. Leveraging Atriplex hortensis choline monooxygenase to improve chilling tolerance in cotton. Environmental and Experimental Botany. June 2019; 162:364-373. (IF3.712)

[5] Yanjiao Yin,Chuanjiao Chen,Shiwei Guo,et al. The Fight Against Panax notoginseng Root-Rot Disease Using Zingiberaceae Essential Oils as Potential Weapons. Frontier in Immunology. October 2018;(IF4.716)

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.

