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(Peroxidase，POD)试剂盒说明书

微量法 100 管/96 样

正式测定前务必取 2-3 个预期差异较大的样本做预测定

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。

测定原理：

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/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

试剂的组成：

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 100μL×1 支，4℃保存；

试剂三：液体 100μL×1 支，4℃保存。

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。

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（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、 在微量石英比色皿或 96 孔板中加入 10μL 样本和 190μL 工作液，混匀，记录 470nm 下 1min 时吸光值 A1 和 2min 后的吸光值 A2 。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。

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：

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，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。

POD（U/mL）=ΔA×V 反总÷V 样÷0.005÷T =4000×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 0.005 为一个酶活力单位。

POD（U/mg prot）= ΔA×V 反总÷（V 样×Cpr）÷0.005÷T =4000×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 0.005 为一个酶活力单位。

POD（U/g 鲜重）= ΔA×V 反总÷(W× V 样÷V 样总)÷0.005÷T =4000×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 0.005 为一个酶活力单位。

POD（U/10^4 cell）= ΔA×V 反总÷(500×V 样÷V 样总)÷0.005÷T =8 ×ΔA

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。