

过氧化物酶(POD)试剂盒说明书

(货号: PB1004F48 分光法 48样)

有效期: 3个月

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、台式离心机、可调式移液器、1mL 玻璃比色皿、研钵、冰和蒸馏水

试剂的组成:

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: 液体 0.33mL×2 瓶, 4℃ 保存; 用时每瓶加入 5mL 试剂一, 现配现用;

试剂三: 液体 10 mL×1 瓶, 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、临用前将试剂一、试剂二、试剂三在 37℃ (哺乳动物) 或 25℃ (其它物种) 预热 10min 以上。

3、样本测定

试剂名称 (μL)	测定孔
试剂一	520
试剂二	130

试剂三	135
蒸馏水	270
样本	15

4、在 1mL 玻璃比色皿中按顺序加入上述试剂，加入样本后立即混匀并计时，混匀，记录470nm 下 30s 时吸 光值 A1 和 1min 30s 后的吸光值 A2。计算 $\Delta A = A2 - A1$ 。

注意：

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。

POD 活性计算：

1、血清（浆）POD 活性

单位的定义：每 mL 血清（浆）在反应体系中每分钟 A470 变化 0.01 定义为一个酶活力单位。

$$\text{POD (U/mL)} = \text{反应总体积 (1070}\mu\text{L)} \div \text{样本体积 (15}\mu\text{L)} \div 0.01 \times \Delta A = 7133 \times \Delta A$$

2、组织 POD 活性

(1) 按样本蛋白浓度计算

单位的定义：每 mg 组织蛋白在反应体系中每分钟 A470 变化 0.01 定义为一个酶活力单位。

$$\text{POD (U/mg prot)} = \text{反应总体积 (1070}\mu\text{L)} \div \text{样本体积 (15}\mu\text{L)} \div 0.01 \times \Delta A \div \text{蛋白质浓度 (mg/mL)} \\ = 7133 \times \Delta A \div \text{蛋白质浓度 (mg/mL)}$$

(2) 按样本鲜重计算

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

$$\text{POD (U/g 鲜重)} = \text{反应总体积 (1070}\mu\text{L)} \div \text{样本体积 (15}\mu\text{L)} \div 0.01 \times \Delta A \div \text{样品质量 (g/mL)} = 7133 \times \Delta A \div \text{样品质量 (g/mL)}$$

3、细菌或细胞 POD 活性

(1) 按样本蛋白浓度计算

单位的定义：每 mg 组织蛋白在反应体系中每分钟 A470 变化 0.01 定义为一个酶活力单位。

$$\text{POD (U/mg prot)} = \text{反应总体积 (1070}\mu\text{L)} \div \text{样本体积 (15}\mu\text{L)} \div 0.01 \times \Delta A \div \text{蛋白质浓度 (mg/mL)} \\ = 7133 \times \Delta A \div \text{蛋白质浓度 (mg/mL)}$$

(2) 按细菌或细胞密度计算

单位的定义：每 1 万个细菌或细胞在反应体系中每分钟 A470 变化 0.01 定义为一个酶活力单位。

$$\text{POD (U/10}^4\text{ cell)} = \text{反应总体积 (1070}\mu\text{L)} \div \text{样本体积 (15}\mu\text{L)} \div 0.01 \times \Delta A \div \text{细菌或细胞密度 (10}^4\text{ cell /mL)} \\ = 7133 \times \Delta A \div \text{细菌或细胞密度 (10}^4\text{ cell /mL)}$$