过氧化物酶(POD)试剂盒说明书

（货号：PB1004F96　分光法　96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 100mL×1 瓶，4℃保存；
试剂一：液体 120mL×1 瓶，4℃保存；
试剂二：液体 0.33ml×4 瓶，4℃保存；用时每瓶加入 5mL 试剂一，现配现用；
试剂三：液体 20 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 lmin 30s 后的吸光值A2 。计算 ΔA =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。

POD（U/mL）=反应总体积（1070μL）÷样本体积（15μL）÷0.01×ΔA =7133×ΔA

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。

POD（U/mg prot）=反应总体积（1070μL）÷样本体积（15μL）÷0.01×ΔA 测定÷蛋白质浓度（mg/mL）=7133×ΔA÷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。

POD（U/g 鲜重）=反应总体积(1070μL)÷样本体积(15μL)÷0.01×ΔA÷样品质量(g/mL)=7133×ΔA÷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。

POD（U/mg prot）=反应总体积（1070μL）÷样本体积（15μL）÷0.01×ΔA÷蛋白质浓度（mg/mL）=7133×ΔA÷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。

POD（U/10^4 cell）=反应总体积（1070μL）÷样本体积（15μL）÷0.01×ΔA÷细菌或细胞密度（10^4 cell /mL）=7133×ΔA÷细菌或细胞密度（10^4 cell /mL）