过氧化物酶(POD)试剂盒说明书

（货号：PB1004W48 微量法 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/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 50mL×1 瓶，4℃保存；

试剂一：液体 10mL×1 瓶，4℃保存；

试剂二：液体 0.1×1 瓶，4℃保存；用时每瓶加入 1.5mL 试剂一，现配现用；

试剂三：液体 3 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：

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 、 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	120
试剂二	30
试剂三	30

蒸馏水	60
样本	5

4、在 EP 管中按顺序加入上述试剂，立即混匀并计时，立即取 200μL 转移至微量石英比色皿或 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。

注意：

若一次性测定样本较多，可将试剂一、二、三和蒸馏水按比例配成混合液，室温放置，测定时加入240μL混合液和5μL样本测定。

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：

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。

计算公式：

POD（U/mL）=ΔA×V 反总÷V 样÷0.01÷T =4900×ΔA

2、组织、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）＝ΔA×V 反总÷（Cpr×V 样）÷0.01÷T =4900×ΔA÷Cpr

（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）＝ΔA×V 反总÷(V 样÷V 样总×W)÷0.01÷T =4900×ΔA÷W

（3）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/104 cell）＝ΔA×V 反总÷(V 样÷V 样总×500)÷0.01÷T =9.8×ΔA

V 反总：反应体系总体积，245μL； V 样：加入样本体积，5μL；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：样品质量；500：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

单位的定义：每 mL 血清（浆）在反应体系中每分钟 A470 变化 0.005 定义为一个酶活力单位。

计算公式：

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

2、组织、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 0.005 定义为一个酶活力单位。

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

（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 0.005 定义为一个酶活力单位。

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

（3）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 0.005 定义为一个酶活力单位。

POD（U/104 cell）＝ΔA×V 反总÷(V 样÷V 样总×500)÷0.005÷T =19.6×ΔA

V 反总：反应体系总体积，245μL； V 样：加入样本体积，5μL；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：样品质量；500：细胞总数，500 万。