

过氧化物酶(POD)试剂盒说明书

(货号:ADS-W-KY003-48 微板法 48 样 有效期: 9 个月)

一、指标介绍:

过氧化物酶 (POD, EC 1.11.1.7) 广泛存在于动物、植物、微生物和培养细胞中, 是普遍存在的一种重要的氧化还原酶, 其活性高低与抗性密切相关。在过氧化物酶催化下, H_2O_2 氧化愈创木酚生成红棕色产物, 该产物在 470nm 处有最大光吸收, 故可通过测 470nm 下吸光值变化测定过氧化物酶活性。

二、试剂盒组分与配制:

试剂组分	试剂规格	存放温度
提取液	液体 60mL×1 瓶	4℃保存
试剂一	液体 2.5mL×1 瓶	4℃避光保存
试剂二	液体 10mL×1 瓶	4℃避光保存
试剂三	液体 0.6mL×1 支	4℃避光保存

三、实验器材:

研钵 (匀浆机)、冰盒 (制冰机)、台式离心机、可调式移液枪、水浴锅 (烘箱、培养箱、金属浴)、96 孔板、离心管、酶标仪、蒸馏水 (去离子水、超纯水均可)。

四、指标测定:

建议先选取 1-3 个差异大的样本 (例如不同类型或分组) 进行预实验, 熟悉操作流程, 根据预实验结果确定或调整样本浓度, 以防造成样本或试剂不必要的浪费!

1、样本提取:

- ① 组织样本: 称取约 0.1g 组织 (水分充足的样本可取 0.25g), 加入 1mL 提取液, 进行冰浴匀浆。4℃×12000rpm 离心 10min, 取上清, 置冰上待测。

【注】: 若增加样本量, 可按照组织质量 (g): 提取液体积 (mL) 为 1: 5~10 的比例进行提取。

- ② 液体样本: 直接检测; 若浑浊, 离心后取上清检测。

- ③ 细菌/细胞样本:

先收集细菌或细胞到离心管内, 离心后弃上清; 取约 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); 12000rpm 4℃离心 10min, 取上清, 置冰上待测。

【注】: 若增加样本量, 可按照细菌/细胞数量 (10^4): 提取液 (mL) 为 500~1000: 1 的比例进行提取。

2、检测步骤:

- ① 酶标仪预热 30min 以上 (等仪器过自检程序亦可), 调节波长至 470nm。
- ② 测定前将试剂一、二和三解冻至室温 (25℃)。
- ③ 在 96 孔板中依次加入:

试剂组分 (μL)	测定管
样本	10
试剂一	40
试剂二	140
试剂三	10
混匀, 立即在 470nm 处读取吸光值 A1, 1 分钟后读取 A2, $\Delta A = A2 - A1$ 。	

【注】: 1. 该反应很迅速, 加完试剂三即启动反应, 所以试剂三加完需立即检测, 若 A1 值大于 0.6 或 A2

- 值大于 1.5 或 ΔA 大于 1, 可降低样本量 V_1 (如减至 $5\mu\text{L}$, 则试剂二相应增加), 或对样本上清液用蒸馏水稀释成合适的稀释倍数后再加样测定, 则改变后 V_1 或稀释倍数 D 需代入公式重新计算。
2. 若 ΔA 小于 0.005, 可增加样本量 V_1 (如增至 $20\mu\text{L}$, 则试剂二相应减少), 或可延长反应时间 T (如延长到 5min 后读取 A_2), 则改变后的 V_1 和 T 需代入公式重新计算。
 3. 若上升趋势不稳定, 可全部加完稳定几分钟后读取 A_1 , 选取一段线性增长范围读取 A_2 。
 4. 若检测体系不变, 可按照样本检测数量, 预先把试剂一和二和三按照 40:140:10 比例配成所需体积的混合液, 在加样表中直接加一枪 $190\mu\text{L}$ 混合液即可。

五、结果计算:

1、按样本鲜重计算:

酶活定义: 每克组织每分钟在反应体系中使 470nm 处吸光值增加 1 为一个酶活单位 U。

$$\text{POD}(\Delta\text{OD}_{470}/\text{min/g 鲜重}) = \Delta A \div (W \times V_1 \div V) \div 1 \div T \times D = 100 \times \Delta A \div W \times D$$

2、按样本蛋白浓度计算:

酶活定义: 每毫克组织蛋白每分钟在反应体系中使 470nm 处吸光值增加 1 为一个酶活单位 U。

$$\text{POD}(\Delta\text{OD}_{470}/\text{min/mg prot}) = \Delta A \div (V_1 \times \text{Cpr}) \div 1 \div T \times D = 100 \times \Delta A \div \text{Cpr} \times D$$

3、按液体体积计算:

酶活定义: 每毫升液体每分钟在反应体系中使 470nm 处吸光值增加 1 为一个酶活单位 U。

$$\text{POD}(\Delta\text{OD}_{470}/\text{min/mL}) = \Delta A \div V_1 \div 1 \div T \times D = 100 \times \Delta A \times D$$

4、按细胞数量计算:

酶活定义: 每 10^4 个细胞每分钟在反应体系中使 470nm 处吸光值 1 为一个酶活单位 U。

$$\text{POD}(\Delta\text{OD}_{470}/\text{min}/10^4\text{cell}) = \Delta A \div (500 \times V_1 \div V) \div 1 \div T \times D = 0.2 \times \Delta A \times D$$

V ---加入提取液体积, 1 mL;

V_1 ---加入样本体积, 0.01mL;

T ---反应时间, 1 min;

W ---样本质量, g;

500---细胞数量, 万;

D ---稀释倍数, 未稀释即为 1;

Cpr ---样本蛋白质浓度, mg/mL; 建议使用本公司的 BCA 蛋白含量测定试剂盒。