

过氧化物酶(POD)活性检测试剂盒（可见分光光度法）

注意：正式测定前务必取 2-3 个预期差异较大的样本做预测定。

产品货号：FB9335-50

产品规格：50管/48样

产品简介：

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。POD催化H₂O₂氧化特定底物，在470nm有特征光吸收。

产品内容：

- 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；用不完的试剂4℃保存一周；
- 试剂三：液体10 mL×1瓶，4℃保存。

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。

操作步骤：

一、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（10⁴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。

二、测定步骤：

- 分光光度计预热30min以上，调节波长至470nm，蒸馏水调零。
- 测定前将试剂一、二和三37℃（哺乳动物）或25℃（其它物种）放置10min。
- 样本测定表

试剂名称（μL）	测定管
样本	15
蒸馏水	270
试剂一	520
试剂二	130
试剂三	135

在1mL玻璃比色皿中按顺序加入上述试剂，立即混匀并计时，记录470nm下30s时的吸光值A1和1min30s后的吸光值A2。计算 $\Delta A = A2 - A1$ 。

三、POD 活性计算：

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）= $\Delta A \times V_{\text{反总}} \div V_{\text{样}} \div 0.01 \div T = 7133 \times \Delta A$

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）= $\Delta A \times V_{\text{反总}} \div (V_{\text{样}} \times C_{\text{pr}}) \div 0.01 \div T = 7133 \times \Delta A \div C_{\text{pr}}$

(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）= $\Delta A \times V_{\text{反总}} \div (W \times V_{\text{样}} \div V_{\text{样总}}) \div 0.01 \div T = 7133 \times \Delta A \div W$

(3) 按细菌或细胞数量计算

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/10⁴ cell）= $\Delta A \times V_{\text{反总}} \div (500 \times V_{\text{样}} \div V_{\text{样总}}) \div 0.01 \div T = 14.27 \times \Delta A$

V反总：反应体系总体积，1.07mL；V样：加入样本体积，0.015mL；V样总：加入提取液体积，1mL；T：反应时间，1min；Cpr：样本蛋白质浓度，mg/mL；W：样本鲜重，g；500：细菌或细胞总数，500万。

注意事项：

1、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，在37℃（哺乳动物）或25℃（其它物种）放置10min以上，测定时加入15μL样本和1055μL混合液测定。

2、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。