

过氧化物酶（POD）活性检测试剂盒说明书

产品货号	产品名称	包装规格	测定方法
PMHA1-M48	过氧化物酶(POD)试剂盒	48T	微量法
PMHA1-M96		96T	

一、测定意义

POD 广泛存在于动物、植物、微生物和培养细胞中，是过氧化物酶体的标志酶，是其一类氧化还原酶，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。

二、测定原理

在过氧化物酶（POD）的催化下，过氧化氢将愈创木酚氧化成茶褐色物质，该物质在 470nm 有最大光吸收，故可通过470nm下吸光度的变化测定过氧化物酶的活性。

三、试剂组成

试剂名称	试剂装量(48T)	试剂装量(96T)	保存条件
提取液	液体 60mL×1 瓶	液体 110mL×1 瓶	4℃ 保存
试剂一	液体 6mL×1 瓶	液体 12mL×1 瓶	4℃ 保存
试剂二	液体 2.5mL×1 瓶	液体 5mL×1 瓶	4℃ 保存
试剂三	液体 2.5mL×1 瓶	液体 5mL×1 瓶	4℃ 保存

四、操作步骤

样本前处理

取一定量植物组织擦净水分及杂质，剪碎后放入研钵，加入液氮，研磨成粉状后转移出来，然后准确称重，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），旋涡混匀抽提 3-5 分钟或者使用组织破碎仪冰浴提取，8000g，4℃ 离心 10min，取上清，置冰上待测。

测定步骤

- 1、分光光度计预热 30min 以上，调节波长至 470nm，蒸馏水调零。
- 2、测定前将试剂恢复至常温。
- 3、工作液的配制：临用前将试剂一、试剂二、试剂三按照 11（μL）：4（μL）：4（μL）的比例混匀，现配现用。
- 4、在 96 孔板或者微量比色皿中依次加入 10 μL 样本和 190μL 工作液，轻轻振荡或敲打混匀，记录 470nm 下 30s 时吸光值 A1 和 1min30s 后的吸光值 A2。计算 $\Delta A = A2 - A1$ 。

五、POD 活性计算

计算公式如下

A、使用微量比色皿比色

(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。

$$\begin{aligned}\text{计算公式: POD (U/mg prot)} &= \Delta A \times V_{\text{反总}} \div (V_{\text{样}} \times C_{\text{pr}}) \div 0.01 \div T \\ &= 2000 \times \Delta A \div C_{\text{pr}}\end{aligned}$$

(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。

$$\begin{aligned}\text{计算公式: POD (U/g 鲜重)} &= \Delta A \times V_{\text{反总}} \div (W \times V_{\text{样}} \div V_{\text{样总}}) \div 0.01 \div T \\ &= 2000 \times \Delta A \div W\end{aligned}$$

V 反总：反应体系总体积，0.2mL；

V 样：加入样本体积，0.01mL；

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：样本质量 g；

B、使用 96 孔板比色

(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 0.005 为一个酶活力单位。

$$\begin{aligned}\text{计算公式: POD (U/mg prot)} &= \Delta A \times V_{\text{反总}} \div (V_{\text{样}} \times C_{\text{pr}}) \div 0.005 \div T \\ &= 4000 \times \Delta A \div C_{\text{pr}}\end{aligned}$$

(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 0.005 为一个酶活力单位。

$$\begin{aligned}\text{计算公式: POD (U/g 鲜重)} &= \Delta A \times V_{\text{反总}} \div (W \times V_{\text{样}} \div V_{\text{样总}}) \div 0.005 \div T \\ &= 4000 \times \Delta A \div W\end{aligned}$$

V 反总：反应体系总体积，0.2mL；

V 样：加入样本体积，0.01mL；

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：样本质量 g；

七、注意事项

- 1、样本测试前请选取 2 个预期差异最大的样本，稀释成不同浓度进行预试，以选取最佳取样浓度；
- 2、样本测定值如果小于 0.005，可将反应时间延长到 3-5 分钟，计算时除以相应的反应时间即可；如果高于 0.5 或者反应液中有较多气泡产生，可将样本用提取液进行稀释，计算时乘以相应的稀释倍数即可。

八、公司介绍

陌凡生物科技有限公司是一家专业从事转基因检测、食品安全以及动植物疫病检测为核心业务的生物科技公司。能够为客户提供动植物疫病检测试剂、小分子抗原抗体、植物激素、植物抗体、重组蛋白等优质产品。自主研发了涵盖分子生物学、细胞生物学、免疫学、生物医学等领域的各种试剂盒。产品覆盖面广，品质可靠。