

过氧化物酶(POD)活性检测试剂盒说明书

Peroxidase Assay Kit

微量法

货号: AK099

规格: 100T/96S

产品组成及保存条件:

编号	规格	储存条件
提取液 ES08	100ml×1 瓶	4℃ 保存;
AK099-A	20ml×1 瓶	4℃ 保存;
AK099-B	液体×1 瓶	4℃ 保存; 用时每瓶加入 3mL AK099-A; 用不完的试剂 4℃ 可保存 3 天;
AK099-C	3ml×1 瓶	4℃ 保存;

※ 正式测定前务必取 2-3 个预期差异较大的样本做预测定。

简介:

意义: 过氧化物酶(Peroxidase, 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。

原理: POD 催化 H_2O_2 氧化特定底物, 在 470nm 有特征光吸收。

自备用品:

可见分光光度计/酶标仪、离心机、微量玻璃比色皿/96 孔板、水浴锅、可调式移液枪、研钵、冰和双蒸水。

粗酶液提取:

1. 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 ES08 (mL) 为 500~1000: 1 的比例 (建议 500 万细菌或细胞加入 1mL 提取液 ES08, 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); 然后 8000g 4℃ 离心 10min, 取上清, 置冰上待测。
2. 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。
3. 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. 试剂准备见产品组成及保存条件列表。
3. AK099-A/B/C 在 37℃ (哺乳动物) 或 25℃ (其它物种) 放置 10min。
4. 在微量玻璃比色皿或 96 孔板中按列表中顺序加入上述试剂,

试剂名称	测定管 (ul)
样本	10
蒸馏水	60
AK099-A	120
AK099-B	30
AK099-C	30
立即混匀并计时, 记录 470nm 下 30s 时的吸光值 A1 和 1min 30s 后的吸光值 A2。计算 $\Delta A = A2 - A1$ 。	

POD 活性计算:

a. 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： $POD (U/mL) = \Delta A \times V_{反总} \div V_{样} \div 0.01 \div T = 2500 \times \Delta A$

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。

计算公式： $POD (U/mg \text{ prot}) = \Delta A \times V_{反总} \div (V_{样} \times Cpr) \div 0.01 \div T = 2500 \times \Delta A \div Cpr$

(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。

计算公式： $POD (U/g \text{ 鲜重}) = \Delta A \times V_{反总} \div (W \times V_{样} \div V_{样总}) \div 0.01 \div T = 2500 \times \Delta A \div W$

(3) 按细菌或细胞密度计算

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。

计算公式： $POD (U/10^4 \text{ cell}) = \Delta A \times V_{反总} \div (500 \times V_{样} \div V_{样总}) \div 0.01 \div T = 5 \times \Delta A$

注：V 反总：反应体系总体积，0.25mL；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；500：细菌或细胞总数，500 万。

b. 用 96 孔板测定的计算公式如下

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 0.005 为一个酶活力单位。

计算公式： $POD (U/mL) = \Delta A \times V_{反总} \div V_{样} \div 0.005 \div T = 5000 \times \Delta A$

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 0.005 为一个酶活力单位。

计算公式： $POD (U/mg \text{ prot}) = \Delta A \times V_{反总} \div (V_{样} \times Cpr) \div 0.005 \div T = 5000 \times \Delta A \div Cpr$

(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。

计算公式： $POD (U/g \text{ 鲜重}) = \Delta A \times V_{反总} \div (W \times V_{样} \div V_{样总}) \div 0.005 \div T = 5000 \times \Delta A \div W$

(3) 按细菌或细胞密度计算

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 0.005 为一个酶活力单位。

计算公式： $POD (U/10^4 \text{ cell}) = \Delta A \times V_{反总} \div (500 \times V_{样} \div V_{样总}) \div 0.005 \div T = 10 \times \Delta A$

注：V 反总：反应体系总体积，0.25mL；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；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 AK099-A/B/C 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 10μL 样本和 240μL 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。