

过氧化物酶(Peroxidase, POD)试剂盒说明书

微量法 100 管/96 样

正式测定前取 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 100mL×1 瓶, 4℃ 保存;

试剂一: 液体 20mL×1 瓶, 4℃ 保存;

试剂二: 液体×1 瓶, 4℃ 保存; 用时加入 3mL 试剂一充分溶解待用; 用不完的试剂 4℃ 保存一周;

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、测定前将试剂一、二和三在 37℃ (哺乳动物) 或 25℃ (其它物种) 放置 10min 以上。

3、样本测定表

试剂名称 (μ L)	测定孔
样本	10
蒸馏水	60
试剂一	120
试剂二	30
试剂三	30

在微量石英比色皿或 96 孔板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 $\Delta A = A2 - A1$ 。

注意:

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 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。

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:

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

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。

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

(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。

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

(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。

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

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。

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。

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

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。

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

(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。

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

(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。

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

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。