

过氧化物酶（POD）活性检测试剂盒说明书

微量法

注意：本产品试剂有所变动，请注意并严格按照说明书操作

货号：AC10084

规格：100T/96S

产品组成：使用前请认真核对试剂体积与瓶内体积是否一致，有疑问请及时联系本公司工作人员。

试剂名称	规格	保存条件
提取液	液体 110 mL×1 瓶	2-8℃ 保存
试剂一	液体 20 mL×1 瓶	2-8℃ 保存
试剂二	液体 0.04 mL×1 瓶	2-8℃ 保存
试剂三	液体 3 mL×1 瓶	2-8℃ 保存

溶液的配制：

1、试剂二：液体置于试剂瓶内 EP 管中, 使用前需先离心。取0.01mL试剂二加入 3.2 mL 试剂一混合备用（约106T），现配现用，也可根据样品量按比例配置。

产品说明：

POD（EC 1.11.1.7）广泛存在于动物、植物、微生物中，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 在有过氧化氢存在的条件下，能使愈创木酚发生氧化，生成茶褐色物质，该物质在 470nm 有最大光吸收。

注意：实验之前建议选择 2-3 个预期差异大的样本做预实验。如果样本吸光值不在测量范围内建议稀释或者增加样本量进行检测。

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、微量玻璃比色皿/96 孔板、研钵/匀浆器、冰和蒸馏水。

操作步骤：**一、样本处理（可适当调整待测样本量，具体比例可以参考文献）****1、细菌、细胞或组织样本的制备**

细菌或培养细胞：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）样本：直接检测。**二、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 (μL)	测定管
试剂一	120
试剂二	30
试剂三	30
蒸馏水	60
样本	5

在 EP 管中按顺序加入上述试剂，立即混匀并计时，立即取 200μL 转移至微量玻璃比色皿或 96 孔板中，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

a、用微量玻璃比色皿测定的计算公式如下

1、按血清（浆）体积计算

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 定义为一个酶活力单位。

$$\text{POD (U/mL)} = \Delta A \div 0.01 \times V_{\text{反总}} \div V_{\text{样}} \div T = 4900 \times \Delta A$$

2、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 定义为一个酶活力单位。

$$\text{POD (U/mg prot)} = \Delta A \div 0.01 \times V_{\text{反总}} \div (Cpr \times V_{\text{样}}) \div T = 4900 \times \Delta A \div Cpr$$

3、按样本质量计算

单位定义：每 g 组织在每 mL 反应体系中每分钟 A470 变化 0.01 定义为一个酶活力单位。

$$\text{POD (U/g 质量)} = \Delta A \div 0.01 \times V_{\text{反总}} \div (W \div V_{\text{样总}} \times V_{\text{样}}) \div T = 4900 \times \Delta A \div W$$

4、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 定义为一个酶活力单位。

$$\text{POD (U/10}^4 \text{ cell)} = \Delta A \div 0.01 \times V_{\text{反总}} \div (500 \div V_{\text{样总}} \times V_{\text{样}}) \div T = 9.8 \times \Delta A$$

b、用 96 孔板测定的计算公式如下

1、按血清（浆）体积计算

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 定义为一个酶活力单位。

$$\text{POD (U/mL)} = \Delta A \div 0.005 \times V_{\text{反总}} \div V_{\text{样}} \div T = 9800 \times \Delta A$$

2、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 定义为一个酶活力单位。

$$\text{POD (U/mg prot)} = \Delta A \div 0.005 \times V_{\text{反总}} \div (Cpr \times V_{\text{样}}) \div T = 9800 \times \Delta A \div Cpr$$

3、按样本质量计算

单位定义：每 g 组织在每 mL 反应体系中每分钟 A470 变化 0.005 定义为一个酶活力单位。

$$\text{POD (U/g 质量)} = \Delta A \div 0.005 \times V_{\text{反总}} \div (W \div V_{\text{样总}} \times V_{\text{样}}) \div T = 9800 \times \Delta A \div W$$

4、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 0.005 定义为一个酶活力单位。

$$\text{POD (U/10}^4 \text{ cell)} = \Delta A \div 0.005 \times V_{\text{反总}} \div (500 \div V_{\text{样总}} \times V_{\text{样}}) \div T = 19.6 \times \Delta A$$

V 反总：反应体系总体积，0.245mL；V 样：加入样本体积，0.005mL；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：样本质量，g；500：细菌或细胞总数，500 万。

注意事项:

- 1、如一次测定的样本数量较多,可将试剂一、二、三和蒸馏水按照比例混合,在 37℃(哺乳动物)或 25℃(其它物种)放置 10min,测定时加入 240 μ L 即可。
- 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。

相关发表文献:

[1] Yin Y J, Chen C J, Guo S W, et al. The fight against *Panax notoginseng* root-rot disease using zingiberaceae essential oils as potential weapons[J]. *Frontiers in plant science*, 2018, 9: 1346.

[2] Dou S, Liu S, Xu X, et al. Octanal inhibits spore germination of *Penicillium digitatum* involving membrane peroxidation[J]. *Protoplasma*, 2017, 254(4): 1539-1545.

[3] Li B, Ding Y, Tang X, et al. Effect of L-Arginine on Maintaining Storage Quality of the White Button Mushroom (*Agaricus bisporus*)[J]. *Food and Bioprocess Technology*, 2019, 12(4): 563-574. (有)

[4] Yanan Wang, Chengzhen Liang, Zhigang Meng, et al. Leveraging *Atriplex hortensis* choline monooxygenase to improve chilling tolerance in cotton. *Environmental and Experimental Botany*. June 2019;162:364-373.(IF3.712)

[5] Yanjiao Yin, Chuanjiao Chen, Shiwei Guo, et al. The Fight Against *Panax notoginseng* Root-Rot Disease Using Zingiberaceae Essential Oils as Potential Weapons. *Frontier in Immunology*. October 2018;(IF4.716)

参考文献:

[1] Reuveni R . Peroxidase Activity as a Biochemical Marker for Resistance of Muskmelon (*Cucumis melo*) to *Pseudoperonospora cubensis*[J]. *Phytopathology*, 1992, 82(7).

[2] Doerge D R , Divi R L , Churchwell M I . Identification of the Colored Guaiacol Oxidation Product Produced by Peroxidases[J]. *Analytical Biochemistry*, 1997, 250(1):10-17.