

组织及血液过氧化物酶（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
AMHA1-C48	组织及血液过氧化物酶（POD）试剂盒	48T	常量法

产品说明：

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。

试剂组成：

试剂名称	规格	保存条件
提取液	液体 60 mL×1 瓶	2-8℃ 保存
试剂一	液体 40 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 10 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0.01 mL 试剂二加入3.2mL 试剂一混合备用（约 24T），现配现用，也可根据样本量按比例配制。

一、样本处理

1、细菌、细胞或组织样本的制备：

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、二和三37℃（哺乳动物）或25℃（其它物种）放置 10min。
- 3、样本测定表：

试剂名称（ μ L）	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 $\Delta A=A_2-A_1$ 。

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。 $POD(U/mL) = \Delta A \times V_{反总} \div V_{样} \div 0.01 \div T$
 $= 7133 \times \Delta A$

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。 $POD(U/mg\ prot) = \Delta A \times V_{反总} \div (V_{样} \times Cpr) \div 0.01 \div T = 7133 \times \Delta A \div Cpr$

(2) 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 为一个酶活力单位。 $POD(U/g\ 质量) = \Delta A \times V_{反总} \div (W \times V_{样} \div V_{样总}) \div 0.01 \div T = 7133 \times \Delta A \div W$

(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。 $POD(U/10^4\ cell) = \Delta A \times V_{反总} \div (500 \times V_{样} \div V_{样总}) \div 0.01 \div T = 14.27 \times \Delta A$

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，1 mL；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：

- 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15 μ L 样本和1055 μ L 混合液测定。
- 如果 ΔA 小于0.005，可将反应时间延长到5min。如果 ΔA 大于0.5 或者反应液中有较多气泡产生，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。