

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-M96	组织及血液过氧化物酶（POD）试剂盒	96T	微量法

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情况下，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。

试剂组成：

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。
- 2、试剂二工作液：取0.01mL 试剂二加入3.2 mL 试剂一混合备用（约 106T），现配现用，也可根据样本量 按比例配制。

操作步骤：

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（ 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、试剂二工作液和试剂三在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
试剂二工作液	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。 $POD \text{ 活性 (U/mL)} = \Delta A \div 0.01 \times V \text{ 反总} \div V \text{ 样} \div T = 4900 \times \Delta A$

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。

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

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。

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

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

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

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。

POD 活性(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。

POD 活性 (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。POD 活性 (U/10⁴ 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，试剂一、试剂二工作液、试剂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 0.8 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。