

## 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，请注意并严格按照该说明书操作。**

**货号：**BC0095

**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，有疑问请及时联系索莱宝工作人员。**

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。
- 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。

### 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：**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、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。

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

###### 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。

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

###### 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°C (哺乳动物) 或 25°C (其它物种) 放置 10min, 测定时加入 240 $\mu$ 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。

### 实验实例:

- 1、取 0.1043g 大鼠心脏加入 1mL 提取液进行冰浴匀浆。8000g, 4°C离心 10min, 取上清置冰上, 用提取液稀释 2 倍后按照测定步骤操作, 用微量玻璃比色皿测定并计算  $\Delta A = A_2 - A_1 = 0.6257 - 0.2351 = 0.3906$ 。按样本质量计算含量得:

$$\text{POD (U/g 质量)} = 4900 \times \Delta A \div W \times 2 \text{ (稀释倍数)} = 3.67 \times 10^4 \text{ U/g 质量。}$$

- 2、取羊血清按测定步骤操作, 用微量玻璃比色皿测定并计算  $\Delta A = A_2 - A_1 = 0.0558 - 0.0431 = 0.0127$ 。按样本质量计算含量得:

$$\text{POD (U/mL)} = 4900 \times \Delta A = 62.23 \text{ U/mL}$$

- 3、取 0.1049g 黄杨叶片, 加入 1mL 提取液进行冰浴匀浆。8000g, 4°C离心 10min, 取上清置冰上, 用提取液稀释 2 倍后按照测定步骤操作, 用微量玻璃比色皿测定并计算  $\Delta A = A_2 - A_1 = 0.8512 - 0.1313 = 0.7199$ 。按样本质量计算含量得:

$$\text{POD (U/g 质量)} = 4900 \times \Delta A \div W = 3.363 \times 10^4 \text{ U/g 质量}$$

### 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.

[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.

**相关系列产品:**

BC0190/BC0195 多酚氧化酶 (PPO) 活性检测试剂盒

BC0210/BC0215 苯丙氨酸解氨酶 (PAL) 活性检测试剂盒

BC0170/BC0175 超氧化物歧化酶 (SOD) 活性检测试剂盒

BC0200/BC0205 过氧化氢酶 (CAT) 活性检测试剂盒