

M5 HiPer 过氧化物酶（POD）测试盒使用说明书

产品名称	单位	货号
M5 HiPer 过氧化物酶（POD）测试盒	48T	MF494-01

【储存条件】

4°C保存

【产品简介】

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。

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。

【产品组份】

提取液：液体 60mL×1 瓶，4°C保存；
试剂一：液体 40mL×1 瓶，4°C保存；
试剂二：液体 0.04ml×1 瓶，4°C保存；
试剂三：液体 10 mL×1 瓶，4°C保存。

溶液的配制：

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。

【实验前准备】

可见分光光度计、台式离心机、可调式移液器、1mL 玻璃比色皿、研钵、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（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°C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°C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°C（哺乳动物）或 25°C（其它物种）放置 10min。

3、样本测定表：

试剂名称 (μL)	测定孔
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 $\Delta A=A2-A1$ 。

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。

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

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。

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

(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。

$$\text{POD (U/g 质量)} = \Delta A \times V_{\text{反总}} \div (W \times V_{\text{样}} \div V_{\text{样总}}) \div 0.01 \div T = 7133 \times \Delta A \div W$$

(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。

$$\text{POD (U/104 cell)} = \Delta A \times V_{\text{反总}} \div (500 \times V_{\text{样}} \div V_{\text{样总}}) \div 0.01 \div T = 14.27 \times \Delta A$$

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°C（哺乳动物）或 25°C（其它物种）放置 10min 以上，测定时加入 15μL 样本和 1055μL 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。

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，用玻璃比色皿测定并计算 $\Delta A=A2-A1=0.363-0.134=0.229$ 。按样本质量计算含量得：

$$\text{POD (U/g 质量)} = 7133 \times \Delta A \div W \times 2 \text{ (稀释倍数)} = 3.132 \times 10^4 \text{ U/g 质量}$$

2、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，用玻璃比色皿测定并计算 $\Delta A=A2-A1=0.549-0.11=0.439$ 。按样本质量计算含量得：

$$\text{POD (U/g 质量)} = 7133 \times \Delta A \div W = 2.985 \times 10^4 \text{ U/g 质量}$$

【备注】

本产品仅供科研使用。在确认产品质量出现问题时，本公司承诺为客户免费更换等量的质量合格产品。