

过氧化物酶（POD）活性检测试剂盒说明书

可见分光光度法

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：AC10083

规格：50T/48S

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 60 mL×1 瓶	4℃保存
试剂一	液体 40 mL×1 瓶	4℃保存
试剂二	液体 0.04 mL×1 瓶	4℃保存
试剂三	液体 10 mL×1 瓶	4℃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 3.2 mL 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。

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 H_2O_2 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。

需自备的仪器和用品：

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/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 20%或 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 (μL)	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 $\Delta A = A2 - A1$ 。

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。

计算公式：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。

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

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

(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。

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：

1. 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。
2. 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。

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.