

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、200T/192S

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	100T 规格	200T 规格	保存条件
提取液	液体 110 mL×1 瓶	液体 110 mL×2 瓶	2-8℃保存
试剂一	液体 20 mL×1 瓶	液体 30 mL×1 瓶	2-8℃保存
试剂二	液体 0.04 mL×1 瓶	液体 0.04 mL×1 瓶	2-8℃保存
试剂三	液体 3 mL×1 瓶	液体 7 mL×1 瓶	2-8℃保存

100T、200T 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（掌上离心机甩离即可）。
- 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。

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。

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/细胞超声破碎仪、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。（果浆等含水量高的样本可以适当提高样本质量）

2、血清（浆）样本：直接检测。若有浑浊可离心后取上清进行测定。

注：该试剂盒的样本匀浆上清也可用于 BC0170/BC0175（超氧化物歧化酶）、BC5160/BC5165（超氧化物歧化酶）、BC0020/BC0025（丙二醛）、BC0200/BC0205（过氧化氢酶）、BC0680/BC0685（乳酸脱氢酶）的测定。

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，分光光度计蒸馏水调零。
- 2、测定前将试剂一、试剂二工作液和试剂三在 37°C（哺乳动物）或 25°C（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 $\Delta A = A2 - A1$ 。（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°C（哺乳动物）或 25°C（其它物种）放置 10min，测定时加入 240μL 即可）

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 A470nm 变化 0.01 定义为一个酶活力单位。

$$\text{POD 活性 (U/mL)} = \Delta A \div 0.01 \times V_{\text{反总}} \div V_{\text{样}} \div T \times F = 4900 \times \Delta A \times F$$

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 A470nm 变化 0.01 定义为一个酶活力单位。

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

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 A470nm 变化 0.01 定义为一个酶活力单位。

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

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 A470nm 变化 0.01 定义为一个酶活力单位。

$$\text{POD 活性 (U/10}^4 \text{ cell)} = \Delta A \div 0.01 \times V_{\text{反总}} \div (N \div V_{\text{样总}} \times V_{\text{样}}) \div T \times F = 4900 \times \Delta A \times F$$

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 A470nm 变化 0.005 定义为一个酶活力单位。

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

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 A470nm 变化 0.005 定义为一个酶活力单位。

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

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 A470nm 变化 0.005 定义为一个酶活力单位。

$$\text{POD 活性 (U/g 质量)} = \Delta A \div 0.005 \times V_{\text{反总}} \div (W \div V_{\text{样总}} \times V_{\text{样}}) \div T \times F = 9800 \times \Delta A \div W \times F$$



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 A470nm 变化 0.005 定义为一个酶活力单位。

POD 活性 (U/10⁴ cell) = $\Delta A \div 0.005 \times V_{\text{反总}} \div (N \div V_{\text{样总}} \times V_{\text{样}}) \div T \times F = 9800 \times \Delta A \times F$

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；N：细菌或细胞总数，以万计；F：样本稀释倍数。

注意事项：

- 1、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℃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：

POD 活性 (U/g 质量) = $4900 \times \Delta A \div W \times 2$ (稀释倍数) = 3.67×10^4 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℃离心 10min，取上清置冰上，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：

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

相关发表文献：

[1] Hu XH, Shen S, Wu JL, Liu J, Wang H, He JX, Yao ZL, Bai YF, Zhang X, Zhu Y, Li GB, Zhao JH, You X, Xu J, Ji YP, Li DQ, Pu M, Zhao ZX, Zhou SX, Zhang JW, Huang YY, Li Y, Ning Y, Lu Y, Huang F, Wang WM, Fan J. A natural allele of proteasome maturation factor improves rice resistance to multiple pathogens. *Nat Plants*. 2023 Feb;9(2):228-237. doi: 10.1038/s41477-022-01327-3. Epub 2023 Jan 16. PMID: 36646829.

[2] Liu YS, Tao Y, Yang XZ, Liu YN, Shen RF, Zhu XF. Gibberellic acid alleviates cadmium toxicity in rice by regulating NO accumulation and cell wall fixation capacity of cadmium. *J Hazard Mater*. 2022 Oct 5; 439:129597. doi: 10.1016/j.jhazmat.2022.129597. Epub 2022 Jul 16. PMID: 35868086.

[3] Yang H, Xue Y, Li B, Lin Y, Li H, Guo Z, Li W, Fu Z, Ding D, Tang J. The chimeric gene atp6c confers cytoplasmic male sterility in maize by impairing the assembly of the mitochondrial ATP synthase complex. *Mol Plant*. 2022 May 2;15(5):872-886. doi: 10.1016/j.molp.2022.03.002. Epub 2022 Mar 7. PMID: 35272047.

[4] Zhao H, Qian R, Liang X, Ou Y, Sun C, Lin X. Indium induces nitro-oxidative stress in roots of wheat (*Triticum aestivum*). *J Hazard Mater*. 2022 Apr 15; 428:128260. doi: 10.1016/j.jhazmat.2022.128260. Epub 2022 Jan 12. PMID: 35038664.

[5] Wang L, Lu H, Zhang X, He Y, Zhang J, Guo X, Fu H, Ye G, Shu Q. Disruption of serotonin biosynthesis increases resistance to striped stem borer without changing innate defense response in rice. *J Pineal Res*. 2023 Sep;75(2): e12895. doi: 10.1111/jpi.12895. Epub 2023 Jul 10. PMID: 37392131.

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

