

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：BC0090

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，有疑问请及时联系索莱宝工作人员。

试剂名称	规格	保存条件
提取液	液体 60 mL×1 瓶	2-8℃保存
试剂一	液体 40 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 10 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 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。

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/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。

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 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）	测定管
样本	15
蒸馏水	270
试剂一	520
试剂二工作液	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 A470nm 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 A470nm 变化 0.01 为一个酶活力单位。

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

(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 A470nm 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 A470nm 变化 0.01 为一个酶活力单位。

$$\text{POD (U/10}^4 \text{ cell)} = \Delta A \times V_{\text{反总}} \div (500 \times V_{\text{样}} \div V_{\text{样总}}) \div 0.01 \div T = 14.27 \times \Delta A$$

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；C_{pr}：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、试剂二工作液、试剂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：

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



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

相关发表文献:

- [1] Zhang D, Liu J, Zhang Y, Wang H, Wei S, Zhang X, Zhang D, Ma H, Ding Q, Ma L. Morphophysiological, proteomic and metabolomic analyses reveal cadmium tolerance mechanism in common wheat (*Triticum aestivum* L.). *J Hazard Mater.* 2023 Mar 5; 445:130499. doi: 10.1016/j.jhazmat.2022.130499. Epub 2022 Nov 25. PMID: 36455318.
- [2] Chen Q, Cao Y, Li H, Liu H, Liu Y, Bi L, Zhao H, Jin L, Peng R. Sodium nitroprusside alleviates nanoplastics-induced developmental toxicity by suppressing apoptosis, ferroptosis and inflammation. *J Environ Manage.* 2023 Nov 1; 345:118702. doi: 10.1016/j.jenvman.2023.118702. Epub 2023 Aug 1. PMID: 37536135.
- [3] Zhao X, Zhang Y, Ma Y, Zhang L, Jiang Y, Liang H, Wang D. Inhibitory mechanism of low-oxygen-storage treatment in postharvest internal bluing of radish (*Raphanus sativus*) roots. *Food Chem.* 2021 Dec 1; 364:130423. doi: 10.1016/j.foodchem.2021.130423. Epub 2021 Jun 19. PMID: 34198034.
- [4] Zhang Y, Hu Y, Wang Z, Lin X, Li Z, Ren Y, Zhao J. The translocase of the inner mitochondrial membrane 22-2 is required for mitochondrial membrane function during Arabidopsis seed development. *J Exp Bot.* 2023 Aug 17; 74(15):4427-4448. doi: 10.1093/jxb/erad141. PMID: 37105529.
- [5] Su Z, Guan K, Liu Y, Zhang H, Huang Z, Zheng M, Zhu Y, Zhang H, Song W, Li X. Developmental and behavioral toxicity assessment of opicapone in zebrafish embryos. *Ecotoxicol Environ Saf.* 2023 Jan 1; 249:114340. doi: 10.1016/j.ecoenv.2022.114340. Epub 2022 Dec 9. PMID: 36508804.

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

