

过氧化物酶(Peroxidase, POD)试剂盒说明书

微量法 100 管/96 样

正式测定前务必取 2-3 个预期差异较大的样本做预测定

测定意义:

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。

测定原理:

POD 催化 H_2O_2 氧化特定底物, 在 470nm 有特征光吸收。

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、微量石英比色皿/96 孔板、研钵、冰和蒸馏水

试剂的组成:

提取液: 液体 100mL×1 瓶, 4°C 保存;

试剂一: 液体 25mL×1 瓶, 4°C 保存;

试剂二: 液体 100 μ L×1 支, 4°C 保存;

试剂三: 液体 100 μ L×1 支, 4°C 保存。

粗酶液提取:

1、细菌、细胞或组织样品的制备:

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°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) 样品: 直接检测。

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、工作液的配制: 临用前将试剂一、试剂二、试剂三按照 2.6 (mL): 1.5 (μ L): 1 (μ L) 的比例混匀; 在 37°C (哺乳动物) 或 25°C (其它物种) 预热 10min 以上; 现配现用。

3、在微量石英比色皿或 96 孔板中加入 10 μ L 样本和 190 μ L 工作液, 混匀, 记录 470nm 下 1min 时吸光值 A1 和 2min 时的吸光值 A2 (A2 和 A1 的时间间隔为 1min)。计算 $\Delta A = A_2 - A_1$ 。

注意:

① 建议取 2-3 个样本做个预测定, 样本和工作液混匀后很快由橘黄色变成红褐色, A1 值会很大 (>1), 且可能 A2-A1 出现负值, 说明酶活性比较高, 可将样本的提取上清液用提取液或蒸馏水稀释 10-20 倍后重新检测, 10 μ L 上清液+90 μ L 提取液或蒸馏水为稀释 10 倍。计算结果乘以相应的稀释倍数。

② 如果 A1 值很小 (<0.1), 且 ΔA 很小 (<0.005), 且样本和工作液混匀后一段时间没有显色, 说明酶活性很低, 可以延长反应时间到 10min、20min 或 30min, 计算公式代入实际反应时间。

③由于样本本身的问题，不同物种的 POD 差异很大，有的物种活性很高（加入工作液后很快变成了红褐色）；有的物种活性很低（加入工作液后 5 分钟内不变色），吸光值只有小数点后三位的变化。

POD 活性计算：

用微量石英比色皿测定的计算公式如下

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：

$$\text{POD (U/mL)} = \Delta A \times V_{\text{反总}} \div V_{\text{样}} \div 0.01 \div T = 2000 \times \Delta A$$

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。

$$\text{POD (U/mg prot)} = \Delta A \times V_{\text{反总}} \div (V_{\text{样}} \times \text{Cpr}) \div 0.01 \div T = 2000 \times \Delta A \div \text{Cpr}$$

(2) 按样本鲜重计算

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。

$$\text{POD (U/g 鲜重)} = \Delta A \times V_{\text{反总}} \div (W \times V_{\text{样}} \div V_{\text{样总}}) \div 0.01 \div T = 2000 \times \Delta A \div W$$

(3) 按细菌或细胞密度计算

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。

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

V 反总：反应体系总体积，0.2mL； V 样：加入样本体积，0.01mL； V 样总：加入提取液体积，1 mL； T：反应时间，1 min； Cpr：样本蛋白质浓度，mg/mL； W：样本质量； 500：细菌或细胞总数，500 万。

用 96 孔板测定的计算公式如下

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 0.005 为一个酶活力单位。

$$\text{POD (U/mL)} = \Delta A \times V_{\text{反总}} \div V_{\text{样}} \div 0.005 \div T = 4000 \times \Delta A$$

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 0.005 为一个酶活力单位。

$$\text{POD (U/mg prot)} = \Delta A \times V_{\text{反总}} \div (V_{\text{样}} \times \text{Cpr}) \div 0.005 \div T = 4000 \times \Delta A \div \text{Cpr}$$

(2) 按样本鲜重计算

单位定义：每 g 组织在每 mL 反应体系中每分钟 A470 变化 0.005 为一个酶活力单位。

$$\text{POD (U/g 鲜重)} = \Delta A \times V_{\text{反总}} \div (W \times V_{\text{样}} \div V_{\text{样总}}) \div 0.005 \div T = 4000 \times \Delta A \div W$$

(3) 按细菌或细胞密度计算

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 为一个酶活力单位。

$$\text{POD (U/10}^4 \text{ cell)} = \Delta A \times V_{\text{反总}} \div (500 \times V_{\text{样}} \div V_{\text{样总}}) \div 0.005 \div T = 8 \times \Delta A$$

V 反总：反应体系总体积，0.2mL； V 样：加入样本体积，0.01mL； V 样总：加入提取液体积，1 mL； T：反应时间，1 min； Cpr：样本蛋白质浓度，mg/mL； W：样本质量； 500：细菌或细胞总数，500 万。