



过氧化物酶(POD)测试盒说明书(精简版)

(货号: A084-1-1 测动物组织 50 管/48 样)

免责声明: 测试前请仔细阅读说明书,预试后再进行批量实验,否则由此导致的后果用户自行承担!

一、测定原理:

利用过氧化物酶(POD)催化过氧化氢反应的原理,通过测定 420nm 处吸光度的变化得出其酶活性。

二、试剂的组成和配制: (试剂盒有效期 6 个月)

试剂一: 60mL 液体×2 瓶,4℃ 保存。

试剂二: 粉剂×2 瓶,4℃ 保存。临用前每瓶加入 10mL 的双蒸水溶解,4℃ 避光保存。

试剂三: 5mL 液体×1 瓶,4℃ 保存。**试剂三应用液的配制:** 临用前先用双蒸水 15 倍稀释,使得试剂三应用液在 1cm 光径石英比色皿,双蒸水调零波长 240nm 处吸光值保持在 0.4 左右,用多少配多少。若吸光值太高,则加双蒸水稀释,若吸光值太低,则加入适量试剂三。(一般在 25 倍左右稀释)

试剂四: 50mL 液体×1 瓶,4℃ 保存。

三、所需仪器及试剂:

可调 420nm 波长的可见分光光度计及 1cm 石英光径比色皿,以及可调 240nm 波长的紫外分光光度计,涡旋混匀器,离心机,37℃ 水浴锅,秒表,蒸馏水,生理盐水,蛋白测定试剂(本公司有售)。

四、操作步骤:

1、10%组织匀浆上清液的制备:

准确称取组织重量,按重量(g):体积(mL)=1:9 的比例,加入 9 倍体积的生理盐水,冰水浴条件下机械匀浆,制备成 10%的组织匀浆,2500 转/分,离心 10 分钟,取上清液进行测定。

2、操作表:

| | 空白管 | 测定管 |
|--|-----|-----|
| 试剂一 (mL) | 2.4 | 2.4 |
| 试剂二应用液 (mL) | 0.3 | 0.3 |
| 试剂三应用液 (mL) | 0.2 | 0.2 |
| 双蒸水 (mL) | 0.1 | |
| 待测样本 (mL) | | 0.1 |
| 37℃ 水浴准确反应 30 分钟 | | |
| 试剂四 (mL) | 1.0 | 1.0 |
| 混匀后,3500 转/分离心 10 分钟,取上清于 420nm 处,1cm 光径,双蒸水调零测定 OD 值。 | | |

五、计算公式:

1、单位定义: 在 37℃ 条件下,每毫克组织蛋白每分钟催化 1μg 底物的酶量定义为一个酶活力单位。

2、组织过氧化物酶(POD)活力计算公式:

$$\text{POD 活力 (U/mgprot)} = \frac{A_{\text{测定}} - A_{\text{空白}}}{12 \times d} \times \frac{V_{\text{反应}}}{V_{\text{样}}} \div T \times 1000 \div \text{Cpr}$$

d: 比色光径,cm;

V_{反应}: 反应体系总体积,4mL;

V_样: 取样量,0.1mL;

T: 反应时间,30 分钟;

1000: 单位系数换算;

Cpr: 组织匀浆蛋白浓度,mg/prot(prot 指蛋白)。

六、注意事项:

1、本试剂盒测定时也可在反应完成后吸取 200 μL 反应液加到 96 孔板中,酶标仪 420nm (±10nm 范围内都行)处读数,此时光径约为 0.625cm (此值为大概值,并非准确数据)代入计算;

2、试剂三在调浓度时,是在紫外波长下读数,必须使用

石英材质的比色皿(一般比色皿上会有“Q”的字样),否则可能不准;

3、样本测试前请选取 2 例预期差异最大的样本,用生理盐水稀释成不同浓度(如 2%、1%、0.5% 浓度)进行预试,选取最佳浓度(A_{测定}-A_{空白}在 0.2~0.4 内对应的样本浓度)进行正式实验;

4、有些组织可能伴随着高脂或者较深的颜色,此时需要做样本的自身对照管(即按测定管的加试剂方式,将样本放在加完试剂四后再加),计算时 A_{空白}用 A_{对照}代替,空白管就不用做了。

附录 I: POD 标准曲线

1、试剂及配制: 由南京建成生物工程研究所提供并按说明书配制。另取 POD 标准品,用双蒸水稀释成不同浓度,待测。

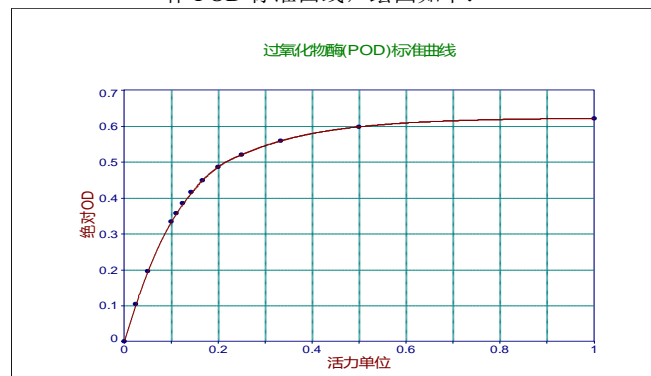
2、操作表:

| | 标准管 | 空白管 |
|---|-----|-----|
| 试剂一 (mL) | 2.4 | 2.4 |
| 试剂二应用液(mL) | 0.3 | 0.3 |
| 试剂三应用液(mL) | 0.2 | 0.2 |
| 双蒸水(mL) | | 0.1 |
| 标准品(mL) | 0.1 | |
| 37℃ 水浴准确反应 30 分钟 | | |
| 试剂四(mL) | 1.0 | 1.0 |
| 混匀后,3500 转/分离心 10 分钟,取上清于 420nm 处,1cm 光径,双蒸水调零,测定 OD 值。 | | |

3、测定结果:

| | | | | | | |
|---------|-------|-------|-------|-------|-------|-------|
| 空白 OD 值 | 0.113 | | | | | |
| 活力单位 | 0.025 | 0.05 | 0.1 | 0.111 | 0.125 | 0.143 |
| 测定 OD 值 | 0.217 | 0.309 | 0.447 | 0.47 | 0.498 | 0.529 |
| 绝对 OD 值 | 0.104 | 0.196 | 0.334 | 0.357 | 0.385 | 0.416 |
| | | | | | | |
| 活力单位 | 0.167 | 0.2 | 0.25 | 0.333 | 0.5 | 1 |
| 测定 OD 值 | 0.562 | 0.6 | 0.634 | 0.673 | 0.712 | 0.735 |
| 绝对 OD 值 | 0.449 | 0.487 | 0.521 | 0.56 | 0.599 | 0.622 |

以 POD 标准品 (U/mL) 为横坐标,以绝对 OD 值为纵坐标,作 POD 标准曲线,绘图如下:



(标准曲线仅供参考,用户无须制作)