

过氧化物酶(POD)测试盒

(货号: BC048 100 管/48 样 测植物)

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×4 瓶,4℃保存。

试剂二: 粉剂×3 瓶,4℃保存。临用每瓶粉剂加入 10mL 的蒸馏水溶解配成**试剂二应用液**, 4℃避光保存。(颜色变深以后弃用)

试剂三: 5mL 液体×1 瓶, 4℃保存。临用前用蒸馏水 15 ~ 30 倍稀释配成**试剂三应用液**, 使得在 1cm 光径、波长 240nm 下, 蒸馏水调零时, 试剂三应用液的吸光值保持在 0.4 左右, 现用现配。若吸光值太高,则加蒸馏水稀释,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×2 瓶, 4℃保存。

三、所需仪器及试剂:

可调 240nm 及 420nm 波长的分光光度计及 1cm 光径石英比色皿, 37℃水浴锅, 生理盐水 (或 PBS), 蒸馏水, 离心机。

四、操作步骤:

1、前处理:

植物组织匀浆的制备: 准确称取植物组织重量, 按照重量 (g) :体积(mL)=1:9 的比例加入 9 倍体积的匀浆介质 (推荐使用生理盐水(0.86%或 0.9%的 NaCl 水溶液)或**磷酸盐缓冲液 : 0.1mol /L pH7 ~ 7.4**), 冰水浴条件下制备成 10%的组织匀浆液, 3500 转/分离心 10 分钟后, 取上清液进行测定。

2、操作表:

	测定管	对照管
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	
蒸馏水(mL)		0.2
样本(mL)	0.1	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,蒸馏水调零, 测定 OD。		

五、计算及举例:

1、定义①: 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。

计算公式①:

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

2、定义②：在 37℃条件下，每克组织每分钟催化 1μg 底物的酶量定义为一个酶活力单位。

计算公式②：

$$\text{POD 活力 (U/g鲜重)} = \frac{A_{\text{测定}} - A_{\text{对照}}}{12 \times d} \times \frac{V_{\text{反应总}}}{V_{\text{样}}} \div T \div \frac{W}{V_{\text{样总}}} \times 1000$$

注： $V_{\text{反应总}}$ ：反应体系总体积，4mL；

$V_{\text{样}}$ ：取样量，0.1mL；

d ：比色光径，1cm；

T ：反应时间，30 分钟；

C_{pr} ：匀浆液蛋白浓度，mgprot/mL（prot 指蛋白）；

W ：组织鲜重，g；

$V_{\text{样总}}$ ：匀浆液总体积，mL。

3、计算举例：

取新鲜桑叶，制备成 10%匀浆，取 100μL 匀浆上清，按照操作表进行操作，测得数据如下：对照 OD 为 0.237；测定 OD 为 0.665；同时测得 10%桑叶匀浆蛋白浓度是 1.80 mgprot/mL 根据公式计算如下：

$$\begin{aligned} \text{POD 活力 (U/mgprot)} &= \frac{0.665 - 0.237}{12 \times 1} \times \frac{4.0}{0.1} \div 30 \div 1.80 \times 1000 \\ &= 26.420\text{U/mg prot} \\ \text{POD活力 (U/g鲜重)} &= \frac{0.665 - 0.237}{12 \times 1} \times \frac{4.0}{0.1} \div 30 \div \frac{0.1}{0.9} \times 1000 \\ &= 428\text{U/g鲜重} \end{aligned}$$

六、注意事项：

- 1、样本测试前请选取 2 例预期差异最大的样本，稀释成不同浓度（推荐 5 倍、10 倍、20 倍稀释）进行预试，选取最佳样本浓度（测定 OD—对照 OD 在 0.2~0.4 内对应的样本浓度为最佳浓度）；
- 2、本试剂盒也可在反应完后吸取 200μL 反应液加到 96 孔板中，酶标仪 420nm（±10nm）处读取吸光值，此时光径约为 0.576cm（此值为大概值，并无准确依据）代入计算；
- 3、试剂三在调浓度时，是在分光光度计 240nm（紫外波长）下，1cm 光径石英比色皿中读数达到 0.4 左右，如非使用石英材质比色皿，可能无法检测。

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，用蒸馏水稀释成不同浓度待测。

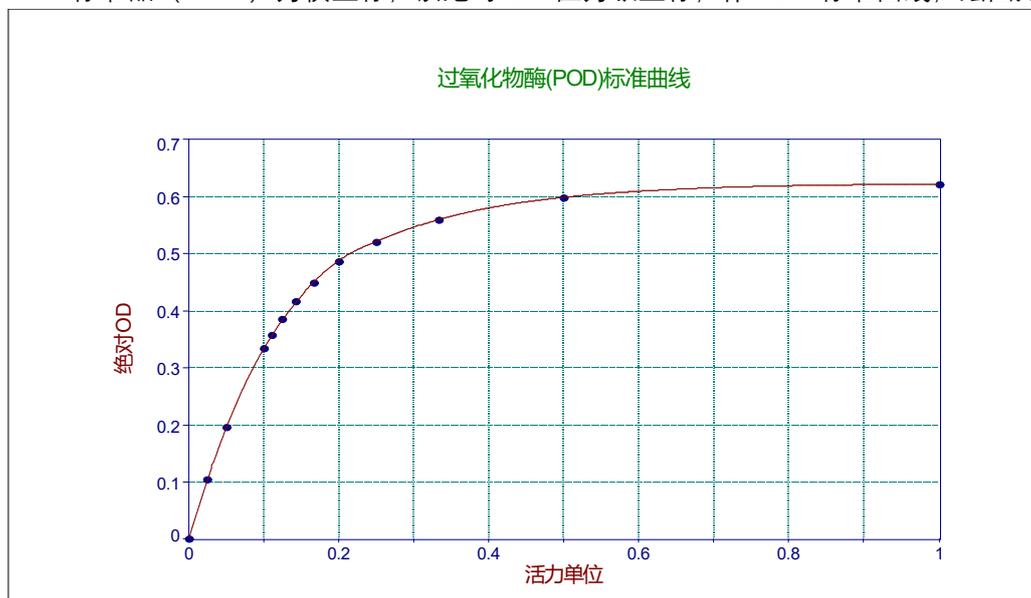
2、操作表：

	空白管	标准管
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
蒸馏水(mL)	0.1	
不同浓度标准品(mL)		0.1
37°C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,蒸馏水调零, 测定 OD		

3、测定结果：

标准品活力	0	0.025	0.05	0.1	0.111	0.125	0.143
测定 OD 值	0.113	0.217	0.309	0.447	0.47	0.498	0.529
绝对 OD 值	0	0.104	0.196	0.334	0.357	0.385	0.416
标准品活力	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:



标准曲线仅供客户参考做预试选取最佳取样浓度 (绝对 OD 值在 0.1-0.3 间, 直线线性较好, 可将样本绝对 OD 控制在该区间), 无需制作。