

# 过氧化物酶(POD)测试盒说明书

(货号: A084-3-1 100管/48样 测植物)

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、试剂组成与配制: (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。临用时往 1 瓶粉剂中加入 10mL 蒸馏水, 混匀, 常温溶解配成试剂二应用液, 4℃ 避光保存。(用多少配多少, 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, 紫外分光光度计测得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, 蒸馏水, 离心机。

## 四、操作步骤:

### 1、前处理:

**植物组织匀浆的制备:** 用水稍微清洗植物表面, 擦去污渍泥土等, 再用吸水纸擦干表面水分, 于研钵中液氮研磨成粉, 准确称取植物粉末重量, 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: 0.01mol/L pH7~7.4), 冰水浴条件下匀浆制备成 10% 的匀浆液, 4000 转/分, 离心 10 分钟后, 取上清液待测。

(注: 有些含水量较高的植物如蔬菜、水果等, 可在清洗过后直接称重, 再按 1 (g): 4 (mL) 的比例加匀浆介质, 然后直接低温 (0~8℃) 匀浆或研磨, 最后 4000 转/分离心 10 分钟后, 取上清液进行测定)

2、操作表: (测试前, 挑选 2 例样本, 稀释不同倍数如 5 倍、10 倍、20 倍等, 按操作表进行预试, 选择 ΔA 值在 0.2 左右对应的样本稀释倍数来进行正式实验)

	测定管	对照管
样本(mL)	0.1	0.1
试剂一 (mL)	2.4	2.4
试剂二应用液(mL)	0.3	0.3
蒸馏水(mL)		0.2
试剂三应用液(mL)	0.2	
37℃水浴准确反应 30 分钟		
试剂四(mL)	1.0	1.0
混匀后, 4000 转/分, 离心 10 分钟, 取上清于 420nm 处, 1cm 光径, 蒸馏水调零, 分光光度计测定各管吸光值 A, 计算 ΔA=A 测定-A 对照。		

## 五、计算及举例:

### 1、植物 POD 活力按蛋白计算:

定义: 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 U。

计算公式:

$$\text{POD 活力 (U/mg 蛋白)} = \frac{\Delta A}{12 \times d} \times \frac{V_{\text{反应总}}}{V_{\text{样}}} \div T \div \text{Cpr} \times 1000$$

### 2、植物 POD 活力按鲜重计算:

定义: 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 U。

计算公式:

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

以上公式中:

V<sub>反应总</sub>: 操作表反应体系总体积, 4mL;

V<sub>样</sub>: 操作表样本加入量, 0.1mL;

d: 比色光径, 1cm;

T: 反应时间, 30 分钟;

Cpr: 匀浆液蛋白浓度, mg/mL;

W: 组织鲜重, g;

V<sub>样总</sub>: 匀浆液总体积, mL;

1000:mg→μg 的转换系数。

## 六、注意事项:

- 1、植物叶片 10% 匀浆上清一般均需要稀释, 而果实、根、茎类大部分情况下不用稀释;
- 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, 比色皿需使用石英材质 (普通玻璃的不可用)。
- 4、有的植物中蛋白含量较低, 故在操作时加完试剂四后, 可能肉眼看不到明显的沉淀物, 但为了实验的准确性, 最好还是要进行离心, 以免少量的固体物混入比色液中, 影响读数。

## 附录 I: POD 标准曲线 (仅供参考)

1、试剂及配制: 取 POD 纯酶 (本试剂盒不提供) 加蒸馏水配成 1U/mL 浓度, 再用蒸馏水稀释成不同浓度操作。

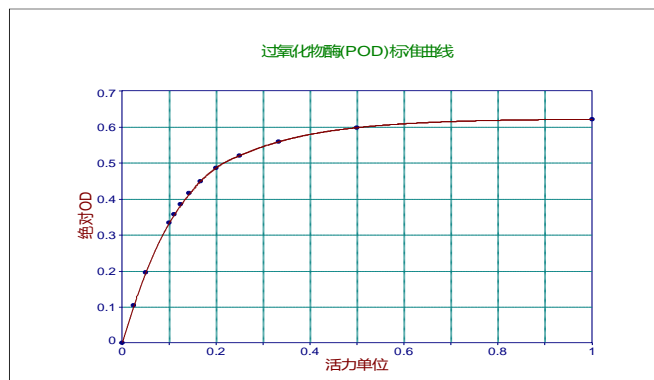
### 2、操作表:

	空白管	标准管
蒸馏水(mL)	0.1	
不同浓度标准品(mL)		0.1
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
混匀, 37℃水浴准确反应 30 分钟		
试剂四(mL)	1.0	1.0
混匀, 4000 转/分, 离心 10 分钟, 取上清于 420nm 处, 1cm 光径, 蒸馏水调零, 测定各管 OD 值。		

### 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	

以标准品浓度 (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 之间，直线线性较好），无需制作。