

植物过氧化物酶(POD)检测试剂盒(愈创木酚比色法)说明书

本产品仅供体外研究使用，不得用于临床诊断

产品简介：

过氧化物酶(peroxisome, POD)是以过氧化氢为电子受体催化底物氧化的酶，主要存在于细胞的过氧化物酶体中，以铁卟啉为辅基，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，该酶属于细胞木质素合成途径中间的关键酶，研究该酶可以探讨多种生物细胞发育过程中木质素沉积的代谢机理，为减少水果石细胞含量提高其品质提供依据。

植物过氧化物酶(POD)检测试剂盒(愈创木酚比色法)检测原理是以愈创木酚(又称 2-甲氧基酚)作为底物，在酶促反应的最适条件下采用每隔一定时间测定产物生成量的方法，于分光光度计 470nm 处测定吸光度，以吸光度变化所需酶量进行计算，主要用于植物组织的裂解液或匀浆液、血清等样品中内源性的过氧化物酶活性，尤其适用于测定水果中过氧化物酶活性。该试剂盒仅用于科研领域，不适用于临床诊断或其他用途。

产品组成：

| 名称 | 规格 | 保存条件 |
|----------------------|-------|-------|
| 植物过氧化物酶(POD)检测试剂盒 | 50T | 4℃ |
| 试剂(A):PODLysisBuffer | 250ml | 4℃ |
| 试剂(B):PODAssayBuffer | 100ml | 4℃避光 |
| 试剂(C):POD 氧化剂 | 4ml | 4℃ |
| 试剂(D):POD 终止液(备选) | 5ml | RT 避光 |
| 使用说明书 | | 1 份 |
| 有效期 | | 6 个月 |

自备材料：

- 1、蒸馏水
- 2、研钵或匀浆器
- 3、离心管
- 4、低温离心机
- 5、水浴锅或恒温箱
- 6、分光光度计、比色杯

操作步骤(仅供参考)：

1、准备样品:

①植物样品: 取 2g 植物组织或水果中层果肉加入 4ml 预冷的 PODLysisBuffer 研磨或匀浆, 4℃ 10000g 离心 15~20min, 留取上清液, 即为 POD 粗提液, -20℃冻存, 用于过氧化物酶的测定。

②血浆、血清和尿液样品: 血浆、血清按照常规方法制备后可以直接用于该试剂盒的测定, -20℃冻存, 用于过氧化物酶的测定。

③细胞或组织样品: 取恰当细胞或组织裂解液, 如有必要用 PODLysisBuffer 进行适当匀浆, 4℃ 10000g 离心 15~20min, 留取上清液, 即为 POD 粗提液, -20℃冻存, 用于过氧化物酶的测定。

④高活性样品: 如果样品中含有较高活性的过氧化物酶, 可以使用 PODLysisBuffer 进行恰当的稀释。

2、配制 PODAssayBuffer 工作液: 取适量的 POD 氧化剂和 PODAssayBuffer, 按 POD 氧化剂: PODAssayBuffer=1: 14 混合, 即为 PODAssayBuffer 工作液, 即配即用, 不宜久置。

3、POD 加样: 按照下表设置对照管、测定管, 注意: 对照管、测定管中为同一待测样品, 但对照管中为提前加热煮沸 5min 的样品, 溶液应按照顺序依次加入, 并注意避免产生气泡, 如果样品中的 POD 活性过高, 可以减少样品用量或适当稀释后再进行测定, 样品的检测最好能设置 2 平行管, 求平均值。

| 加入物(ml) | 对照管 | 测定管 |
|--------------------|-----------------|------|
| 待测样品 | 0.05(提前煮沸 5min) | 0.05 |
| PODLysisBuffer | 1.45 | 1.45 |
| PODAssayBuffer 工作液 | 1 | 1 |

4、POD 测定: 以对照管为对照(调零), 比色杯光径 1.0cm, 立即分光光度计测定 470nm 处测定管的吸光度(记为 A 测定 0); 37℃准确孵育 3min 后, 立即加入 0.05ml POD 终止液终止反应(备选方案), 立即分光光度计测定 470nm 处测定管的吸光度(记为 A 测定 1)。注意: 加入 POD 终止液终止反应不是必须步骤, 可 37℃准确孵育 3min 后直接以对照管为对照(调零), 分光光度计测定 470nm 处测定管的吸光度(记为 A 测定 1)。

计算:

POD 活性单位的定义: 在该实验条件下, 每 1min 吸光度变化 0.01 所需酶量为一个活性单位。

组织样本 $POD(U) = \{(A \text{ 测定 } 1 - A \text{ 测定 } 0) \times VT\} / (W \times VS \times 0.01 \times t)$

式中: A 测定 1=孵育 3min 后测定管的吸光度

A 测定 0=加入 PODAssaybuffer 工作液后立即测定管的吸光度 W=组织样本的重量(g)

VT=提取酶液的总体积(ml)

VS=测定时所用酶液体积(ml)

t=反应时间(min)=3

液体样本 $POD(U) = (A \text{ 测定 } 1 - A \text{ 测定 } 0) / (0.01 \times t)$

式中: A 测定 1=孵育 3min 后测定孔的吸光度值

A 测定 0=加入 PODAssaybuffer 工作液后立即测定的测定孔吸光度值 t=反应时间(min)=3

注意事项:

- 1、待测样品中不能含有酶抑制剂，同时需避免反复冻融。
- 2、POD 酶液提取时注意低温操作，防止酶活性。
- 3、以煮沸的酶液为对照时，酶要充分失活。
- 4、POD 氧化剂和 POD 终止液具有一定腐蚀性，请小心操作。
- 5、POD 氧化剂易挥发，请密闭保存，否则检测效率下降。
- 6、如果没有分光光度计，也可以使用普通的酶标仪测定，每次检测指标不宜过多，否则操作时间不一，有可能导致样本间的差异。
- 7、为了您的安全和健康，请穿实验服并戴一次性手套操作。