



中科瑞泰（北京）生物科技有限公司

Tel: 400-699-0631

http:// www.real-tims.com.cn

E-mail: real-times@vip.163.com

植物过氧化物酶 **POD** 活性测定试剂盒（微板法）
Plant Peroxidase Activity Assay Kit (Microplate Method) Ver.751165-1.0

货号	名称	规格
PD1050M	植物过氧化物酶POD活性测定试剂盒(微板法)	100 次

● 产品组成:

组分货号	名称	规格	贮存
PD1050M-01	提取缓冲液	110 ml	4℃
PD1050M-02	试剂 1-显色剂	5 ml	4℃，避光
PD1050M-03	试剂 2-分析缓冲液	15 ml	4℃
PD1050M-04	试剂 3-酶底物	1.2 ml	4℃，避光

● 产品简介:

过氧化物酶（Peroxidase，POD）是一种活性较高、广泛存在于植物组织器官中的氧化还原酶，以铁卟啉为辅基，能催化过氧化氢（ H_2O_2 ）直接氧化酚类或胺类化合物，具有消除过氧化氢和酚类、胺类毒性的双重作用，有效防止过氧化氢在体内的积累，从而对植物体起到保护作用；同时，过氧化物酶能使植物组织中所含的某些碳水化合物转化成本质素，是细胞木质素合成途径中间的关键酶。所以，POD 与植物体内物质代谢及抗逆性都有着密切关系。

测定原理：用愈创木酚（即邻甲氧基酚，Guaiacol）为过氧化物酶的底物，在过氧化物酶催化下，过氧化氢可将愈创木酚氧化成红棕色的 4-邻甲氧基苯酚，该物质在 470 nm 处有最大吸收，故可通过测 470 nm 下吸光值变化测定过氧化物酶活性。

该试剂盒使用酶标仪，用酶标板测定植物样品中的 POD 活性，以每次提取使用 1 ml 提取液，200 μ l 反应体系计算，该产品可以大约使用 100 次。

本试剂盒适用于检测植物组织中的过氧化物酶(POD)活力，不推荐用于动物组织、动物细胞、细菌以及血清样品中 POD 的检测。

● 贮存、运输及效期:

4℃贮存；常温运输；有效期 6 个月。

● 自备材料:

植物材料；剪刀；研钵；酶标仪（最佳检测波长 470 nm）；酶标板；低温台式离心机；可调式移液器；蒸馏水等。

● 实验准备:

1. 酶标仪预热 30 min，设定波长到 470 nm。
2. 测定前提前 30 min 取出试剂 1、试剂 2 和试剂 3，平衡至常温（25℃）。

3. 提前打开制冰机。

● 操作步骤:

建议正式实验前, 选取 2 个样本做预测定, 了解实验样品情况, 熟悉流程, 避免样本和试剂浪费。

一. 样本 POD 提取:

1.1 取新鲜植物组织, 按照组织质量 (g): 提取液体积 (ml) 为~1: 10 的比例用研钵进行冰浴研磨, 制备成~10%植物匀浆液, 如 0.1 g 植物叶片, 加入 1 ml 提取液, 用研钵进行冰浴研磨。

注: 如果提高研磨效率, 可加入适量石英砂 (试剂盒不提供, 自备) 辅助研磨。

1.2 12000 rpm, 4℃离心 10 min, 取上清, 即为含有 POD 的样本, 置冰上测定。

注: 提取的样本如需贮存, 建议按需分装后-80℃贮存, 两周内使用, 尽量避免反复冻融。

二. 样本测定:

2.1 酶标仪程序设置:

确定使用 470 nm 波长检测; 如果酶标仪可以间隔采集吸光值, 设定检测程序每 1 min 读数一次, 设定多次读数 (一般可以设定 10 次, 时间总长 10 min); 如果酶标仪无此功能, 记录初始吸光值和终止时间的吸光值。

2.2 在酶标板中依次加入:

加入顺序	试剂名称	加入体积 (μl)
		反应总体积 200 μl
1	样本	10
2	试剂 1-显色剂	40
3	试剂 2-分析缓冲液	140
4	试剂 3-酶底物	10
混匀后, 立即在 470 nm 处读取吸光值 A1 以及反应时间后的吸光值 A2, $\Delta A=A2-A1$		

2.3 由于植物样本繁多, 不同物种的 POD 活性差异很大, 有的物种活性很高 (反应启动后混合液颜色很快由橘黄色变为红褐色); 有的物种活性很低 (反应启动后 5 分钟内混合液不变色), 吸光值只有小数点后三位的变化。**强烈建议先取 2-3 个样本做个预测定**, 如果反应启动后混合液颜色很快由橘黄色变成红褐色, A1 值大于 0.6 或 A2 值大于 1.5 或 ΔA 大于 1, 说明酶活性过高, 可降低样本量 V1 (如减至 5 μl, 则试剂 2 相应增加 5 μl), 改变后的 V1 需代入公式重新计算, 也可将样本的提取上清液用提取液稀释 5-10 倍后重新检测, 计算公式中要乘以相应的稀释倍数 (D)。如果 A1 值很小 (<0.05), 且 ΔA 很小 (<0.005), 且反应启动后一段时间没有显色 (一般 5 min 内), 说明酶活性很低, 可增加样本量 V1 (如增至 20 μl, 则试剂 2 相应减少 10 μl), 或可延长反应时间 T (如延长到 5 min 后读取 A2), 改变后的 V1 和 T 需代入公式重新计算。

2.4 若吸光值的上升趋势不稳定, 可全部加完所有试剂后读取各个时间点的吸光值, 根据时间对吸光值的线性回归曲线, 选取一段线性增长范围读取 ΔA 值 (参见实验示例)。

2.5 若检测体系不变, 可按照样本检测数量, 预先把试剂 1, 试剂 2 和试剂 3 按照 40:140:10 比例配成所需体积的混合液, 在加样表中直接加一枪 190 μl 混合液即可。

三. 活性计算:

3.1 按样本鲜重 (FW) 计算:

酶活定义: 每克植物组织鲜重 (FW) 每分钟在 200 μl 反应体系中使 470 nm 处吸光值增加 1 为一个酶活力单位 U。

计算公式: $POD (U/g\ FW) = \Delta A \div (FW \times V1 \div V) \div T \times D$

3.2 按样本蛋白浓度计算:

注: 此方法需要测定提取液的蛋白浓度, 推荐使用 BCA 蛋白浓度测定试剂盒 (货号:RTP7102)。

酶活定义: 每毫克蛋白 (mg prot) 每分钟在 200 μl 反应体系中使 470 nm 处吸光值增加 0.001 为一个酶活力单位 U。

计算公式: $POD (U/mg\ prot) = \Delta A \div (V1 \times Cpr) \div T \div 0.001 \times D$

注解:

V: 步骤 1.1 中加入提取液体积 (μl)

V1: 步骤 2.2 中加入样本的体积 (μl)

T: 步骤 2.2 读取两次 A470 的间隔反应时间 (min)

FW: 步骤 1.1 中样本鲜重质量 (g)

Cpr: 步骤 3.2 中, 样本蛋白浓度 (mg/ml)

D: 步骤 2.3 中, 如果酶活性过高, 需要稀释的倍数, 未稀释即为 1

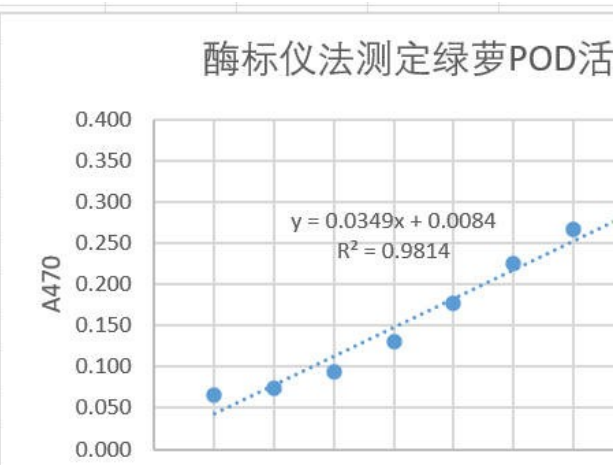
四. 实验示例:

4.1 绿萝 POD 活性测定-按样本鲜重 (FW) 计算:

取 0.5 克绿萝叶片, 加入 5 ml 提取液冰浴匀浆, 制成 10%匀浆液, 12000 rpm 4℃离心 10 min, 取上清置于冰上, 按照测定步骤操作, 三个复孔, 设定酶标仪检测波长 470 nm, 间隔 1 min 采集数据, 采集 10 次; 时间对吸光值做线性回归曲线, 4-6 min 线性较好, 2 min 内 $\Delta A = 0.225 - 0.130 = 0.095$ 。

计算 $POD (U/g\ FW) = 0.095 \div (0.5 \times 10 \div 5000) \div 2 \times 1 = 47.5\ U/g\ FW$

三次复孔平均值	
反应时间	A470
1	0.066
2	0.074
3	0.093
4	0.130
5	0.177
6	0.225
7	0.267
8	0.301
9	0.326
10	0.344



4.2 绿萝 POD 活性测定-按样本蛋白浓度计算:

取 0.5 克绿萝叶片, 加入 5 ml 提取液冰浴匀浆, 制成 10%匀浆液, 12000 rpm 4℃离心 10 min, 取上清置于冰上, BCA 蛋白定量试剂盒 (货号: RTP7102) 测定蛋白浓度为 2 mg/ml; 按照测定步骤操作, 2 个复孔, 设定酶标仪检测波长 470 nm, 间隔 1 min 采集数据, 采集 10 次; 时间对吸光值

做线性回归曲线，4-6 min 线性较好，2 min 内 $\Delta A=0.206-0.140=0.066$ 。酶活定义： 每毫克蛋白（mg prot）每分钟在 200 μ l 反应体系中使 470 nm 处吸光值增加 0.001 为一个酶活力单位 U。计算公式： $POD(U/mg\ prot)=\Delta A\div(V1\times Cpr)\div T\div 0.001\times D$ ； $POD(U/mg\ prot)=0.066\div(10\times 2)\div 2\div 0.001\times 1=1.65\ U/mg\ prot$ 。

2次复孔平均值	
反应时间	A470
1	0.079
2	0.087
3	0.111
4	0.140
5	0.173
6	0.206
7	0.235
8	0.262
9	0.283
10	0.295

