

酚氧化酶（phenoloxidase, PO）试剂盒说明书

(货号：ADS-W-PO001 微板法 96 样 有效期：6 个月)

一、指标介绍：

酚氧化酶（PO, EC 1.14.18.1），也叫酪氨酸酶，是一种含有铜离子结合位点的氧化酶。在昆虫中多称为酚氧化酶。作为一类重要的免疫蛋白，在昆虫免疫防御、表皮鞣化、黑化和伤口愈合等过程中发挥重要作用。

酚氧化酶（PO）能够催化 L-多巴产生醌，后者在 490nm 有特征光吸收，通过检测 490nm 吸收波长的变化速率即可得出 PO 酶活性大小。

二、试剂盒组分与配制：

试剂组分	试剂规格	存放温度	注意事项
提取液	液体 100mL×1 瓶	4℃保存	
试剂一	液体 15mL×1 瓶	4℃保存	
试剂二	粉体 4 瓶	4℃保存	每瓶： 1. 开盖前注意使粉体落入底部（可手动甩一甩）； 2. 加入 3mL 的试剂一溶解（可超声溶解），溶解后的试剂仍 4℃保存且一个月内用完。

三、实验器材：

研钵（匀浆机）、冰盒（制冰机）、台式离心机、可调式移液枪、水浴锅（烘箱、培养箱、金属浴）、96 孔板、离心管、酶标仪、蒸馏水（去离子水、超纯水均可）。

四、指标测定：

建议先选取 1-3 个差异大的样本（例如不同类型或分组）进行预实验，熟悉操作流程，根据预实验结果确定或调整样本浓度，以防造成样本或试剂不必要的浪费！

1、样本提取

① 组织样本：

称取约 0.1g 组织，加入 1mL 提取液，进行冰浴匀浆，4℃×12000rpm，离心 15min，取上清，置冰上待测。

【注】：若增加样本量，可按照组织质量（g）：提取液体积（mL）为 1：5~10 的比例进行提取

② 液体样本：直接检测。若浑浊，离心后取上清检测。

③ 细菌/细胞样本：

先收集细菌或细胞到离心管内，离心后弃上清；取约 500 万细菌或细胞加入 1mL 提取液，超声波破碎细菌或细胞（冰浴，功率 200W，超声 3s，间隔 10s，重复 30 次）；12000rpm 4℃离心 10min，取上清，置冰上待测。

【注】：若增加样本量，可按照细菌/细胞数量（10⁴）：提取液（mL）为 500~1000：1 的比例进行提取。

2、检测步骤

① 酶标仪预热 30min 以上（等仪器过自检程序亦可），调节波长至 490nm。

② 在 96 孔板中依次加入：

试剂组分（μL）	测定管
样本	100
试剂二	100

混匀，立即在 490nm 处读取 A1 值，35°C 孵育 30min 后再读取 A2 值， $\Delta A = A2 - A1$ 。

【注】：若 ΔA 值在零附近，可增加样本取样质量 W（如增至 0.2g），或增加样本上样体积 V1（如增至 150 μ L，试剂二不变），或延长 35°C 孵育时间 T（如增至 60min 读取 A2），则改变后的 W 和 V1 和 T 需代入公式重新计算。

五、结果计算：

1、按样本鲜重计算：

单位定义：每分钟每克组织在反应体系中使 490nm 处吸光值变化 0.001 为一个酶活单位(U)。

$$PO(\Delta OD_{490}/\text{min/g 鲜重}) = \Delta A \div (W \times V1 \div V) \div 0.001 \div T = 333.3 \times \Delta A \div W$$

2、按样本蛋白浓度计算：

单位定义：每分钟每毫克组织蛋白在反应体系中使 490nm 处吸光值变化 0.001 为一个酶活单位(U)。

$$PO(\Delta OD_{490}/\text{min/mg prot}) = \Delta A \div (V1 \times Cpr) \div 0.001 \div T = 333.3 \times \Delta A \div Cpr$$

3、按照液体体积计算：

单位定义：每分钟每毫升液体在反应体系中使 490nm 处吸光值变化 0.001 为一个酶活单位(U)。

$$PO(\Delta OD_{490}/\text{min /mL}) = \Delta A \div V1 \div 0.001 \div T = 333.3 \times \Delta A$$

4、按细胞数量计算：

单位定义：每分钟每 10⁴ 个细胞在反应体系中使 490nm 处吸光值变化 0.001 为一个酶活单位(U)。

$$PO(\Delta OD_{490}/\text{min /}10^4 \text{ cell}) = \Delta A \div (500 \times V1 \div V) \div 0.001 \div T = 333.3 \times \Delta A \div 500$$

V---加入提取液体积，1 mL；

V1---加入样本体积，0.1mL；

T---反应时间，30min；

W---样本质量，g；

500---细胞数量，万；

Cpr---样本蛋白质浓度，mg/mL；建议使用本公司的 BCA 蛋白含量检测试剂盒。