

酚氧化酶 (phenoloxidase, PO) 试剂盒说明书

(微板法 96 样)

一、产品简介:

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:

试剂名称	规格	保存要求	备注
提取液	液体 100mL×1 瓶	4°C保存	
试剂一	液体 15mL×1 瓶	4°C保存	
试剂二	粉体 mg×4 支	4°C保存	用前取一支甩几下使粉体落入底部, 再加 3mL 的试剂一溶解 (可超声溶解), 溶解后的试剂仍 4°C保存且一个月内用完。

三、需自备的仪器和用品:

酶标仪、96 孔板、台式离心机、水浴锅、可调式移液器、研钵、冰和蒸馏水。

四、酚氧化酶 (PO) 的测定:

建议正式实验前选取 2 个样本做预测定, 了解本批样品情况, 熟悉实验流程, 避免实验样本和试剂浪费!

1、样本制备

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°C×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°C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 (10^4): 提取液 (mL) 为 500~1000: 1 的比例进行提取。

2、上机检测

① 酶标仪预热 30min 以上, 调节波长至 490nm。

② 在 96 孔板中依次加入:

试剂名称 (μ L)	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 $^{\circ}$ 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)。

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

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。
