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℃保存	
试剂一	液体 15mL×1 瓶	4℃保存	
试剂二	粉体 mg×4 支	4℃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℃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℃×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（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（μL）	测定管
样本	100
试剂二	100
混匀，立即在 490nm 处读取 A1 值，35℃孵育 30min 后再读取 A2 值，△A= A2- A1。	

【注】：若△A 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 150μL，试剂二不变），或延长 35℃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(ΔOD_{490}/min/g 鲜重)=ΔA÷(W×V1÷V)÷0.001÷T=333.3×ΔA÷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(ΔOD_{490}/min/mg prot)=ΔA÷(V1×Cpr)÷0.001÷T=333.3×ΔA÷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(ΔOD_{490}/min /mL)=ΔA÷V1÷0.001÷T=333.3×ΔA

4、按细胞数量计算：

单位定义：每分钟每 10^4 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(ΔOD_{490}/min /mL)= ΔA÷(500×V1÷V)÷0.001÷T =333.3×ΔA÷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。