

乳酸氧化酶 (LOD) 活性测定试剂盒说明书

(分光法48样)

一、产品简介:

乳酸氧化酶(LOD, EC 1.1.3.2) 是一种常见于多种微生物中的氧化还原酶, 在微生物的能量代谢、乳酸清除代谢中发挥不可替代的作用。

乳酸氧化酶催化乳酸和氧反应生成丙酮酸和过氧化氢, 过氧化氢和特异显色剂反应产生(粉)红色产物, 该产物在510nm有最大吸收峰, 进而得到乳酸氧化酶活性大小。

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60mL×1瓶	4℃保存	物
试剂一	液体15mL×1瓶	4℃保存	
试剂二	液体15mL×1瓶	4℃保存	
试剂三	液体×1支	4℃保存	临用前甩几下使液体落入底部, 每次吸取15 μL液体至一个空的2mLEP管, 再往EP管中加入1mL蒸馏水混匀备用(半个月内存用)。
标准管	液体mL×1支	4℃保存	

三、所需仪器和用品:

可见分光光度计、1mL 玻璃比色皿(光径1cm)、天平、水浴锅、移液器、研钵、离心机。

四、乳酸氧化酶 (LOD) 活性测定:

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: 取约0.1g 组织样本(水分充足的样本建议取0.2g 左右), 加1mL 的提取液冰浴匀浆, 粗提液全部转移到EP 管中, 12000rpm, 4℃ 离心10min, 上清液待测。

②细胞/细菌样本: 先收集细胞到离心管内, 离心后弃上清; 取约500万细胞/细菌加入1mL 的提取液, 超声波破碎细胞/细菌(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, 可按照细胞数量(10⁶):提取液 (mL) 为500~1000:1的比例进行提取。

③液体样本: 直接检测。若浑浊, 离心后取上清检测。

2、上机检测:

①可见分光光度计预热30min, 设定波长到510nm, 蒸馏水调零。

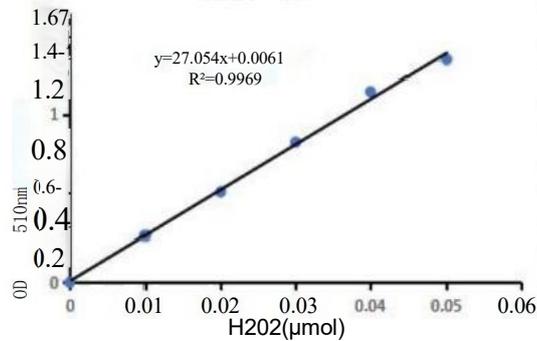
②所有室温至室温(25℃)。在1mL玻璃比色皿(光径1cm)中依次加入:

试剂名称 (μL)	测定管
试剂一	300
试剂二	300
样本	60
混匀, 37℃ 孵育5min	
试剂三	40
混匀, 于510nm下读取吸光值A1, 37℃ 孵育20min后读取吸光值A2, ΔA=A2-A1。	

【注】:若 ΔA 值小于0.01,则增加样本加样体积 V_1 (如增至100 μL 或更多,则试剂一相应减少),或延长反应时间 T (如延长至40min 或 60min), 或增加取样质量 W 。 则改变后的 V_1 和 T 和 W 需代入公式重新计算。

五、结果计算:

1、标准曲线: $y=27.054x+0.0061$; x 为 H_2O_2 标准品 (μmol), y 为 ΔA 。



2、按样本鲜重计算:

单位定义: 在 37°C , 每克组织每小时生成1 $\mu\text{molH}_2\text{O}_2$ 定义为一个酶活单位 (U)。

$$\text{LOD}(\mu\text{mol/h/g 鲜重})=[(\Delta A-0.0061)\div 27.054]\div(W\times V_1\div V)\div T=1.85\times(\Delta A-0.0061)\div W$$

3、按样本蛋白浓度计算:

单位定义: 在 37°C , 每毫克组织蛋白每小时生成1 $\mu\text{molH}_2\text{O}_2$ 定义为一个酶活单位(U)。

$$\text{LOD}(\mu\text{mol/h/mg prot})=[(\Delta A-0.0061)\div 27.054]\div(V_1\times \text{Cpr})\div T=1.85\times(\Delta A-0.0061)\div \text{Cpr}$$

4、按细胞/细菌数量计算:

单位定义: 在 37°C , 每 10^4 个细胞/细菌每小时生成1 nmolH_2O_2 定义为一个酶活单位(U)。

$$\text{LOD}(\text{nmol/h}/10^4\text{cell})=[(\Delta A-0.0061)\div 27.054]\div(500\times V_1\div V)\times 10^3\div T=3.7\times(\Delta A-0.0061)$$

5、按液体体积计算:

单位定义: 在 37°C , 每毫升液体每小时生成1 $\mu\text{molH}_2\text{O}_2$ 定义为一个酶活单位 (U)。

$$\text{LOD}(\text{nmol/h/mL})=[(\Delta A-0.0061)\div 27.054]\div V_1\div T=1.85\times(\Delta A-0.0061)$$

V ---加入提取液体积, 1mL;

V_1 ---加入样本体积, 0.06mL;

T --- 反应时间, 20min=1/3h;

W ---样本质量, g;

50 --- 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。

附: 标准曲线制作过程:

- 1 制备标准品母液 (250 $\mu\text{mol/mL}$)。
- 2 把母液用蒸馏水稀释成以下浓度: 0, 0.5, 1, 1.5, 2, 2.5 $\mu\text{mol/mL}$ 。也可根据实际调整浓度。
- 3 在 1mL 玻璃比色皿 (光径 1cm) 中直接加入: 60 μL 标准品+300 μL 试剂一+300 μL 试剂二+40 μL 蒸馏水混匀, 室温放置5min 于510nm 处读值, 依据结果即可制作标准曲线。