

乳酸氧化酶（LOD）活性测定试剂盒说明书

（货号：G0898W 微板法 96 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 120mL×1 瓶	4℃保存	
试剂一	液体 15mL×1 瓶	4℃保存	
试剂二	液体 8mL×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 15μL 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：

酶标仪、96 孔板、天平、移液器、研钵、水浴锅、离心机、蒸馏水。

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：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 提取液研磨，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（10⁴）：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：

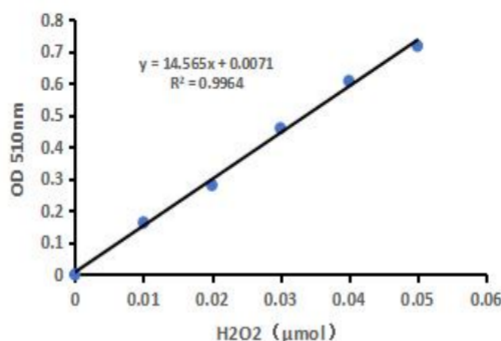
- ① 酶标仪预热 30min，设定波长到 510nm。
- ② 所有室温至室温（25℃）。在 96 孔板中依次加入：

试剂名称（μL）	测定管
试剂一	100
试剂二	60
样本	20
混匀，37℃孵育 5min	
试剂三	20
混匀，于 510nm 下读取吸光值 A1，37℃孵育 20min 后读取吸光值 A2， $\Delta A = A2 - A1$ 。	

【注】：若 ΔA 值小于 0.01，则增加样本加样体积 V_1 （如增至 50 μ L 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： $y = 14.565x + 0.0071$ ： x 为 H_2O_2 标准品(μ mol)， y 为 ΔA 。



2、按样本鲜重计算：

单位定义：在 37℃，每克组织每小时生成 1 μ mol H_2O_2 定义为一个酶活单位（U）。

$LOD (\mu\text{mol/h/g 鲜重}) = [(\Delta A - 0.0071) \div 14.565] \div (W \times V_1 \div V) \div T = 10.3 \times (\Delta A - 0.0071) \div W$

3、按样本蛋白浓度计算：

单位定义：在 37℃，每毫克组织蛋白每小时生成 1 μ mol H_2O_2 定义为一个酶活单位（U）。

$LOD (\mu\text{mol/h/mg prot}) = [(\Delta A - 0.0071) \div 14.565] \div (V_1 \times C_{pr}) \div T = 10.3 \times (\Delta A - 0.0071) \div C_{pr}$

4、按细胞/细菌数量计算：

单位定义：在 37℃，每 10⁴ 个细胞/细菌每小时生成 1nmol H_2O_2 定义为一个酶活单位（U）。

$LOD (\text{nmol/h}/10^4 \text{ cell}) = [(\Delta A - 0.0071) \div 14.565] \div (500 \times V_1 \div V) \times 10^3 \div T = 20.6 \times (\Delta A - 0.0071)$

5、按液体体积计算：

单位定义：在 37℃，每毫升液体每小时生成 1 μ mol H_2O_2 定义为一个酶活单位（U）。

$LOD (\text{nmol/h/mL}) = [(\Delta A - 0.0071) \div 14.565] \div V_1 \div T = 10.3 \times (\Delta A - 0.0071)$

V ---加入提取液体积，1 mL；

V_1 ---加入样本体积，0.02mL；

T ---反应时间，20min=1/3h；

W ---样本质量，g；

500---细胞数量，万；

C_{pr} ---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 μ 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 μ mol/mL。也可根据实际调整浓度。
- 3 在 96 孔板中直接加入：20 μ L 标准品+100 μ L 试剂一+60 μ L 试剂二+20 μ L 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。