

胆固醇氧化酶（COD）活性测定试剂盒说明书

（货号：G0935W 微板法 96 样）

一、产品简介：

胆固醇氧化酶（COD，EC 1.1.3.6）广泛存在于各种生物体内，在胆固醇代谢研究和相关检测中扮演关键角色。

胆固醇氧化酶催化胆固醇和氧反应生成胆甾烯酮和过氧化氢，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，进而得到胆固醇氧化酶活性大小。

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 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	粉体 mg×1 支	4℃保存	临用前甩几下使粉体落入底部，加入 0.517mL 乙醇超声至粉体全部溶解，再用乙醇稀释 10 倍后开始检测。
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、胆固醇氧化酶（COD）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（ 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，设定波长到 510nm。

② 所有室温至室温（25℃）。在 96 孔板中依次加入：

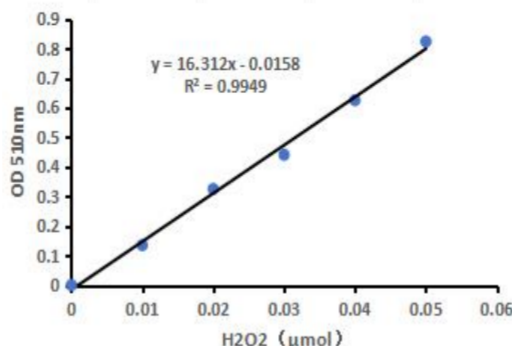
试剂名称（ μ L）	测定管
试剂一	100
试剂二	60
样本	20
混匀，37℃孵育 5min	
试剂三	20
混匀，于 510nm 下读取吸光值 A1，37℃孵育 20min 后读取吸光值 A2， $\Delta A = A2 - A1$ 。	

【注】：若 ΔA 值小于 0.01，则增加样本加样体积 V1（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 V1 和 T 和 W 需代入公式重新计算。

五、结果计算:

1、标准曲线: $y = 16.312x - 0.0158$: 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 $1\mu\text{mol}H_2O_2$ 定义为一个酶活单位 (U)。

$$\text{COD} (\mu\text{mol/h/g 鲜重}) = [(\Delta A + 0.0158) \div 16.312] \div (W \times V1 \div V) \div T = 9.2 \times (\Delta A + 0.0158) \div W$$

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 $1\mu\text{mol}H_2O_2$ 定义为一个酶活单位 (U)。

$$\text{COD} (\mu\text{mol/h/mg prot}) = [(\Delta A + 0.0158) \div 16.312] \div (V1 \times \text{Cpr}) \div T = 9.2 \times (\Delta A + 0.0158) \div \text{Cpr}$$

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 $1\text{nmol}H_2O_2$ 定义为一个酶活单位 (U)。

$$\text{COD} (\text{nmol/h}/10^4 \text{ cell}) = [(\Delta A + 0.0158) \div 16.312] \div (500 \times V1 \div V) \times 10^3 \div T = 18.4 \times (\Delta A + 0.0158)$$

V---加入提取液体积, 1 mL;

V1---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;

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 96 孔板中直接加入: $20\mu\text{L}$ 标准品+ $100\mu\text{L}$ 试剂一+ $60\mu\text{L}$ 试剂二+ $20\mu\text{L}$ 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。