

漆酶活性检测试剂盒说明书

微量法

货号：AC10346

规格：100T/96S

产品组成：使用前请认真核对试剂体积与瓶内体积是否一致，有疑问请及时联系本公司工作人员。

试剂名称	规格	保存条件
提取液	液体 110 mL×1 瓶	4°C保存
试剂一	液体 20 mL×1 瓶	4°C保存
试剂二	粉剂×2 瓶	4°C保存

溶液的配制：

- 1、工作液的配制：一瓶试剂二用 10 mL 试剂一溶解。现用现配。

产品说明：

漆酶（CE1.10.3.2）是一种含铜的多酚氧化酶，属于铜蓝氧化酶家族，漆酶存在菇、菌及植物中，是一种环保型酶，其独特的催化性质在生物检测中有广泛的应用。

漆酶分解底物ABTS产生ABTS自由基，在420nm处的吸光系数远大于底物ABTS，测定ABTS自由基的增加速率，可计算得漆酶活性。

注意：实验之前建议选择 2-3 个预期差异大的样本做预实验。如果样本吸光值不在测量范围内建议稀释或者增加样本量进行检测。

需自备的仪器和用品：

可见分光光度计/酶标仪、低温离心机、微量玻璃比色皿/96孔板、可调式移液枪、天平、研钵/匀浆器、冰和蒸馏水，水浴锅

操作步骤：

一、样本处理（可适当调整待测样本量，具体比例可以参考文献）

1、组织 按照组织质量（g）：提取液体积(mL)为 1：5~10 的比例（建议称取约 0.1g 组织，加入 1mL 提取液），进行冰浴匀浆。10000g 4°C离心 10min，取上清，置冰上待测。

2、细胞：按照细胞数量（10⁴个）：提取液体积（mL）为 500~1000：1 的比例（建议 500 万细胞加入 1mL 提取液），冰浴超声波破碎细胞（功率 300w，超声 3 秒，间隔 7 秒，总时间 3min），然后 4°C，10000g 离心 10min，取上清置于冰上待测。

- 3、培养液：直接检测。

二、测定步骤

1. 分光光度计/酶标仪预热 30min 以上，调节波长至 420nm，分光光度计蒸馏水调零。
2. 水浴锅温度调至 45°C。
3. 操作表：在微量玻璃比色皿/96 孔板中分别加入下列试剂：

样本名称	测定管	空白管
样本 (μL)	30	
蒸馏水 (μL)	-	30
工作液 (μL)	170	170

在微量玻璃比色皿/96孔板中分别加入上述试剂，充分混匀后于420nm处测定10s时的吸光值A1，迅速置于45°C水浴3min，拿出迅速擦干测定190s时的吸光值A2，计算ΔA测定管=A2测定-A1测定，ΔA空白管=A2空白-A1空白，ΔA=ΔA测定管-ΔA空白管。(空白管只需做1-2次)

三、漆酶活性计算

1. 按微量玻璃比色皿：

(1) 按蛋白浓度计算

酶活定义：每毫克蛋白每分钟氧化1nmol底物ABTS所需的酶量为一个酶活力单位。

$$\text{漆酶酶活 (U/mg prot)} = \Delta A \div (\epsilon \times d) \times V_{\text{反总}} \times 10^9 \div (V_{\text{样}} \times C_{\text{pr}}) \div T = 61.7 \times \Delta A \div C_{\text{pr}}$$

(2) 按样本质量计算

酶活定义：每克样本每分钟氧化1nmol底物ABTS所需的酶量为一个酶活力单位。

$$\text{漆酶酶活 (U/g 质量)} = \Delta A \div (\epsilon \times d) \times V_{\text{反总}} \times 10^9 \div (V_{\text{样}} \times W \div V_{\text{样总}}) \div T = 61.7 \times \Delta A \div W$$

(3) 按细胞数量计算

酶活定义：每10⁴个细胞每分钟氧化1nmol底物ABTS所需的酶量为一个酶活力单位。

$$\text{漆酶酶活 (U/10}^4 \text{ cell)} = \Delta A \div (\epsilon \times d) \times V_{\text{反总}} \times 10^9 \div (V_{\text{样}} \times 500 \div V_{\text{样总}}) \div T = 0.123 \times \Delta A$$

(4) 按液体体积计算

酶活定义：每mL液体每分钟氧化1nmol底物ABTS所需的酶量为一个酶活力单位。

$$\text{漆酶酶活 (U/mL)} = \Delta A \div (\epsilon \times d) \times V_{\text{反总}} \times 10^9 \div V_{\text{样}} \div T = 61.7 \times \Delta A$$

ε: ABTS摩尔消光系数: 36000L/mol/cm; d: 比色皿光径, 1cm; V反总: 反应总体积, 2×10⁻⁴L; V样: 反应中样本体积, 0.03mL; V样总: 加入提取液体积, 1mL; Cpr: 样本蛋白浓度, mg/mL, 蛋白浓度需自行测定; W, 样本质量, g; T: 反应时间, 3min; 500: 细胞总数, 500万; 10⁹: 单位换算系数, 1mol=10⁹nmol。

2. 按96孔板计算：

将上述计算公式中的d-1cm换为d-0.6cm(96孔板光径)进行计算即可。

注意事项：

- 1、工作液需临用前配制，并且尽快使用，4°C保存一周，若变色则不能使用。
- 2、测定之前进行预实验，若吸光值较高，请将样本用提取液进行适当的稀释再测定，并在计算公式中乘以稀释倍数。
- 3、空白管为检测各试剂组分质量的检测孔，正常情况下，OD值变化不超过0.05。

实验实例：

1. 取0.1g香菇加1mL提取液进行样本处理，取上清后按照测定步骤操作，用微量玻璃比色皿测得计算ΔA测定管=A2测定-A1测定=0.8963-0.1004=0.7959，ΔA空白管=A2空白-A1空白=0.0729-0.0542=0.0187，ΔA=ΔA测定管-ΔA空白管=0.7959-0.0187=0.7772，按样本质量计算酶活得：
漆酶酶活(U/g质量)=61.7×ΔA÷W=61.7×0.7772÷0.1=479.53 U/g质量。