

木质素过氧化物酶 (Lip) 活性检测试剂盒说明书

紫外分光光度法

注意：本产品试剂有所变动，请注意并严格按照该说明书操作。

货号：AC10341

规格：50T/48S

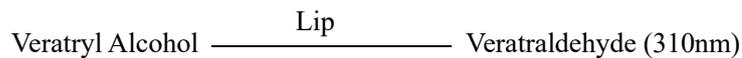
产品内容：使用前请认真核对试剂体积与瓶内体积是否一致，有疑问请及时联系本公司工作人员。

试剂名称	规格	保存条件
试剂一	液体 85mL×1 瓶	2-8°C保存
试剂二	液体 11mL×1 瓶	2-8°C保存
试剂三	液体 6mL×1 瓶	2-8°C保存

产品说明：

木质素过氧化物酶 (EC1.11.1.14) (Lip) 是一种含亚铁血红素的过氧化物酶，是木质素的生物降解过程中的主要木质素降解酶类。Lip 在饲料资源开发以及废水、废物处理领域有着广阔的应用前景。

藜芦醇可以被 Lip 催化发生氧化反应，其产物藜芦醛在 310nm 处有最大吸收峰，以藜芦醇为反应底物，通过测定 310nm 处藜芦醛的吸光值，可以判定 Lip 的酶活性。



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：

紫外分光光度计、低温离心机、水浴锅/恒温培养箱、可调式移液器、超声波细胞破碎仪、研钵/匀浆器、1mL 石英比色皿、冰和蒸馏水。

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：按照样本质量 (g)：试剂一体积 (mL) 为 1:5~10 的比例（建议称取约 0.1g 组织，加入 1mL 试剂一）加入试剂一，冰浴匀浆；10000g 4°C离心 10min，取上清置冰上待测。

2、细菌或细胞样本：收集细菌或细胞到离心管内，离心后弃上清，按照细菌或细胞数量 (10^4 个)：试剂一体积 (mL) 为 500~1000:1 的比例（建议 500 万细菌或细胞加入 1mL 试剂一）加入试剂一，超声波破碎细菌或细胞（冰浴，功率 300W，超声 3s，间隔 7s，总时间 3min），10000g 4°C离心 10min，取上清置冰上待测。

3、培养液或其他液体：直接检测。若溶液浑浊则离心后取上清进行测定。

二、测定步骤

1、可见分光光度计预热 30min 以上，调节波长至 310nm，蒸馏水调零。

2、测定前根据实验用量取出部分试剂一、试剂二、试剂三置于 37°C 预热 10min 以上。若一次性测定样本过多，可根据使用量将试剂一、二、三按 6:2:1 比例配成工作液后进行预热，测定时按照 100 μ L 样本+900 μ L 工作液加入 1mL 石英比色皿进行测定。

3、加样表（在 1mL 石英比色皿中依次加入下列试剂）：

试剂名称 (μL)	测定管
试剂一 (μL)	600
试剂二 (μL)	200
样本 (μL)	100
试剂三 (μL)	100

将上述试剂分别加入 1mL 石英比色皿后迅速吹打混匀，从加完最后一个试剂开始计时，记录第 15s 的吸光值 A1，将混合液置于 37°C 水浴锅/恒温培养箱培养 5min，取出测定 5min15s 时的吸光值 A2，计算 $\Delta A = A2 - A1$ ，注意保证测定时间的准确性。

三、Lip 活力的计算

1. 按样本蛋白质浓度计算

酶活定义：37°C，pH4.5 条件下，每 mg 组织蛋白每分钟氧化 1nmol 藜芦醇所需的酶量为一个酶活单位。

$$\text{Lip 活性 (U/mg prot)} = \Delta A \times V_{\text{反总}} \div (\epsilon \times d) \times 10^9 \div (V_{\text{样}} \times C_{\text{pr}}) \div T = 215.05 \times \Delta A \div C_{\text{pr}}$$

2. 按样本质量计算

酶活定义：37°C，pH4.5 条件下，每 g 组织每分钟氧化 1nmol 藜芦醇所需的酶量为一个酶活单位。

$$\text{Lip 活性 (U/g 质量)} = \Delta A \times V_{\text{反总}} \div (\epsilon \times d) \times 10^9 \div (V_{\text{样}} \div V_{\text{样总}} \times W) \div T = 215.05 \times \Delta A \div W$$

3. 按细菌/细胞数量计算

酶活定义：37°C，pH4.5 条件下，每 10⁴ 细菌/细胞每分钟氧化 1nmol 藜芦醇所需的酶量为一个酶活单位。

$$\text{Lip 活性 (U/10}^4 \text{ cell)} = \Delta A \times V_{\text{反总}} \div (\epsilon \times d) \times 10^9 \div (V_{\text{样}} \div V_{\text{样总}} \times \text{细胞数量}) \div T = 215.05 \times \Delta A \div \text{细胞数量}$$

4. 按照样本体积计算

酶活定义：37°C，pH4.5 条件下，每 mL 血清或液体样本每分钟氧化 1nmol 藜芦醇所需酶量为一个酶活单位。

$$\text{Lip 活性 (U/mL)} = \Delta A \times V_{\text{反总}} \div (\epsilon \times d) \times 10^9 \div V_{\text{样}} \div T = 215.05 \times \Delta A$$

ϵ : 藜芦醛摩尔消光系数: 9300L/mol/cm; d: 比色皿光径, 1cm; $V_{\text{反总}}$: 反应总体积, 0.001L; $V_{\text{样}}$: 加入样本体积, 0.1mL, $V_{\text{样总}}$: 提取液体积, 1mL; C_{pr} : 样本蛋白质浓度, mg/mL; W: 样本质量, g; T: 反应时间, 5 min; 10⁹: 单位换算系数, 1mol=10⁹nmol。

实验实例:

取 0.09g 杏鲍菇加入 1mL 试剂一进行冰浴匀浆。10000g 4°C 离心 10min，取上清置冰上，之后按照测定步骤操作，测得计算 A1=0.228, A2=0.55, $\Delta A = A2 - A1 = 0.322$ ，按样本质量计算酶活得：

$$\text{Lip 活性 (U/g 质量)} = \Delta A \times V_{\text{反总}} \div (\epsilon \times d) \times 10^9 \div V_{\text{样}} \div T = 672.95 \text{U/g 质量。}$$

参考文献:

- [1] Konadu K T, Harrison S, Osseo-Asare K. et al. Transformation of the carbonaceous matter in double refractory gold ore by crude lignin peroxidase released from the white-rot fungus[J]. International Biodeterioration & Biodegradation, 2019, 143(1996):104735.
- [2] Ahmed AA Q, Mckay T J M. Potential of Bacillus sp. LG7 as a Promising Source of Ligninolytic Enzymes for Industrial and Biotechnological Applications[J]. Proceedings of the National Academy of sciences India, 2017.

相关系列产品:

- AC10345/AC10346 漆酶活性检测试剂盒
 AC10343/AC10344 锰过氧化物酶 (Mnp) 活性检测试剂盒