

漆酶活性检测试剂盒

可见分光光度法

注意：正式测定前务必取2-3个预期差异较大的样本做预测定。

货号：BC1630

规格：50T/48S

产品内容：

提取液：液体 60mL×1 瓶，4℃保存。

试剂一：液体 50mL×1 瓶，4℃保存。

试剂二：粉剂×2 瓶，4℃避光保存。

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。

试验中所需的仪器和试剂：

可见分光光度计、低温离心机、1mL 玻璃比色皿、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、粗酶液提取：

- （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℃离心 10min，取上清，置冰上待测。
- （2）细胞：按照细胞数量（ 10^4 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℃，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、分光光度计预热 30min 以上，调节波长至 420nm，蒸馏水调零。
- 2、水浴锅温度调至 45℃。
- 3、工作液的配制：一瓶试剂二用 25mL 试剂一溶解。现用现配。
- 4、操作表：在 1mL 玻璃比色皿中分别加入下列试剂：

样本名称	测定管	空白管
样本（ μL ）	150	
蒸馏水（ μL ）	-	150
工作液（ μL ）	850	850

在1mL 玻璃比色皿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℃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， $\Delta A = \Delta A$ 测定管- ΔA 空白管。空白管只需做一次。

三、漆酶活计算

（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

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

(2) 按样本质量计算

酶活定义：每克样品每分钟氧化 1nmol 底物 ABTS 所需的酶量为一个酶活力单位。漆酶酶活 (U/g 鲜重) = $\Delta A \div \epsilon \div d \times V_{\text{反总}} \times 10^9 \div (V_{\text{样}} \times W \div V_{\text{样总}}) \div T = 61.7 \times \Delta A \div W$

(3) 按细胞数量计算

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

(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。漆酶酶活 (U/ 10^4 cell) = $\Delta A \div \epsilon \div d \times V_{\text{反总}} \times 10^9 \div V_{\text{样}} \div T = 61.7 \times \Delta A$

ϵ : ABTS 摩尔消光系数: 36000L/mol/cm; d : 比色皿光径, 1cm; $V_{\text{反总}}$: 反应总体积, 0.001L; $V_{\text{样}}$: 反应中样本体积, 0.15mL; $V_{\text{样总}}$: 加入提取液体积, 1mL; C_{pr} : 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。

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, 请将样品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。

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。