

漆酶 (Laccase) 试剂盒说明书

(货号: BP10310W 微板法 96 样 有效期: 3 个月)

一、指标介绍:

漆酶 (EC 1.10.3.2) 是一种含铜的多酚氧化酶, 属于铜蓝氧化酶家族, 广泛分布于真菌和高等植物中, 具有较强的氧化还原能力, 在纸浆生物漂白, 环境污染降解和木质纤维素降解以及生物检测方面有非常广泛的应用。

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。

二、试剂盒组分与配制

试剂组分	试剂规格	存放温度	注意事项
提取液	液体 100mL×1 瓶	4℃避光保存	
试剂一	液体 12mL×1 瓶	4℃保存	
试剂二	粉剂 4 支	4℃避光保存	每支: 1. 临用前 8000g 4° C 离心 2min 使试剂落入管底 (可手动甩一甩); 2. 每支加 1.5mL 蒸馏水充分溶解, 4℃保存一周, 若变色则不能使用。

三、实验器材:

研钵 (匀浆机)、冰盒 (制冰机)、台式离心机、可调式移液枪、水浴锅 (烘箱、培养箱、金属浴)、96 孔板、离心管、酶标仪、蒸馏水 (去离子水、超纯水均可)。

四、指标测定:

建议先选取 1-3 个差异大的样本 (例如不同类型或分组) 进行预实验, 熟悉操作流程, 根据预实验结果确定或调整样本浓度, 以防造成样本或试剂不必要的浪费!

1、样本提取

① 组织样本:

称取约 0.1g 组织, 加入 1mL 提取液, 进行冰浴匀浆。12000rpm, 4℃离心 10min, 取上清, 置冰上待测。

【注】: 若增加样本量, 可按照组织质量 (g): 提取液体积 (mL) 为 1: 5~10 的比例进行提取。

② 细菌/细胞样本:

先收集细菌或细胞到离心管内, 离心后弃上清; 取 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); 12000rpm, 4℃离心 10min, 取上清置冰上待测。

【注】: 若增加样本量, 可按照细菌/细胞数量 (10^4): 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、检测步骤:

① 酶标仪预热 30min 以上, 调节波长至 420nm。

② 在 96 孔板中依次加入:

试剂组分 (μL)	测定管
样本	30
试剂一	120
试剂二	50
25℃, 立即于 420nm 处读取吸光值 A1, 反应 5min 后读取 A2, $\Delta A = A2 - A1$ 。	

【注】若 ΔA 差值较小,可增加样本量 V_1 (如由 30 μ L 增至 60 μ L,则试剂一相应减少)或延长反应时间 T (如由 5min 增至 15min),则改变后的样本体积 V_1 和反应时间 T 则代入计算公式重新计算。

五、结果计算:

1. 按照蛋白浓度计算:

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。

漆酶活性(nmol/min/mg prot)=[$\Delta A \div (\epsilon \times d) \times V_2 \times 10^9$] $\div (V_1 \times C_{pr}) \div T = 74.07 \times \Delta A \div C_{pr}$

2. 按照样本质量计算:

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。

漆酶活性(nmol/min/g 鲜重)=[$\Delta A \div (\epsilon \times d) \times V_2 \times 10^9$] $\div (W \times V_1 \div V) \div T = 74.07 \times \Delta A \div W$

3. 按照细胞数量计算:

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。

漆酶活性(nmol/min/ 10^4 cell)=[$\Delta A \div (\epsilon \times d) \times V_2 \times 10^9$] $\div (\text{细胞数量} \times V_1 \div V) \div T$
 $= 74.07 \times \Delta A \div \text{细胞数量}$

4. 按照液体体积计算:

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

漆酶活性(nmol/min/mL)=[$\Delta A \div (\epsilon \times d) \times V_2 \times 10^9$] $\div V_1 \div T = 74.07 \times \Delta A$

ϵ ---ABTS 摩尔消光系数: $36 \times 10^3 \text{ L/mol/cm}$;

d ---96 孔板光径, 0.5cm;

V_2 ---反应总体积, 0.2mL= $2 \times 10^{-4} \text{ L}$;

V_1 ---反应中样本体积, 0.03mL;

V ---加入提取液体积, 1mL;

W ---样本质量, g;

T ---反应时间, 5min;

细胞数量---万;

C_{pr} ---样本蛋白浓度, mg/mL; 建议使用本公司的 BCA 蛋白含量检测试剂盒。