

木质素过氧化物酶（Lignin peroxidase, Lip）试剂盒说明书

（货号：BP10466F 紫外法 48 样 有效期：3 个月）

一、指标介绍：

木质素过氧化物酶（EC1.11.1.14）是一种含亚铁血红素的过氧化物酶，属于木质素降解酶系，在木质素生物降解、造纸工业、纺织工业、芳香化合物转化与降解及环境污染控制等方面具有较大的应用潜力。

木质素过氧化物酶（LiP）氧化藜芦醇生成藜芦醛，藜芦醛在 310nm 处有特征吸收峰。通过测定 310nm 处的藜芦醛的增加速率，即可得到木质素过氧化物酶（LiP）酶活性大小。

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 120mL×1 瓶	4℃保存	
试剂一	— A：液体 1 支 — B：空瓶 1 瓶	4℃避光保存	1. 临用前甩几下 EP 管（— A）使液体落入底部，再向 EP 管中加入 0.5mL 蒸馏水混匀溶解，全部转移至空瓶 B 中； 2. 再向 EP 管中加入 0.5mL 蒸馏水涮洗后全部转移至 B 瓶中（可分别再用 0.5mL 蒸馏水涮洗 EP 管 2 次），最后再加 7mL 蒸馏水混匀后做为试剂一待用（总体积为 9mL）； 3. 用不完的试剂 4℃保存。
试剂二	液体 1 支	4℃避光保存	1. 临用前 8000g 4℃离心 2min 使试剂落入管底； 2. 取 2 个新的 EP 管，每管取 3.3 μL 液体，再加 2mL 蒸馏水混匀备用； 3. 保存周期与试剂盒有效期相同。

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）、1ml 石英比色皿、离心管、紫外分光光度计、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：

取约 0.1g 组织（水分充足的样本可取 0.5g），加入 1mL 提取液，进行冰浴匀浆。4℃×12000rpm 离心 10min，取上清，置冰上待测。

【注意】若样本颜色较深（如植物叶片），可引起起始值 A1 值较大如超过 1.5，可在样本提取过程中增加除色素步骤：取约 0.1g 组织（水分充足的样本可取 1g），加入 80%乙醇冰浴匀浆，12000rpm，4℃离心 10min，弃掉色素较深的上清液；以上除色素步骤重复 2 次。最后向离心得到的沉淀中加入 1mL 提取液，混匀或再次冰浴匀浆，12000rpm，4℃离心 10min，取上清置冰上待测。

② 细菌或培养细胞：

先收集细菌或细胞到离心管内，离心后弃上清；取约 500 万细菌或细胞加入 1mL 提取液，超声波破碎细菌或细胞（功率 300w，超声 3 秒，间隔 7 秒，总时间 3min）；4℃×12000rpm 离心 10min，取上清，置冰上待测。

【注】：若增加样本量，可按照数量（10⁴）：提取液体积（mL）为 500-1000：1 的比例进行提取

- ③ 液体样本：若是澄清液体，直接检测，若液体样本浑浊，需 4°C×12000rpm，离心 10min，取上清液检测。

2、检测步骤：

- ① 紫外分光光度计预热 30min 以上，调节波长至 310nm，蒸馏水调零。
- ② 所有试剂至常温状态（25°C）。
- ③ 在 1mL 石英比色皿（光径 1cm）中依次加入：

试剂组分（μL）	测定管
提取液	480
样本上清液	80
试剂一	160
试剂二	80
充分混匀，30°C条件下，10s 时于 310nm 处读取 A1，5min 后再读取 A2， $\Delta A = A2 - A1$ 。	

【注】：若 ΔA 在零附近，可增加取样质量 W（如增至 0.2g 或更多），或增加样本加样体积 V1（如增至 200μL 或更多，则加样体系中提取液相应减少），或延长反应时间 T（由 5min 增加至 10min 或更长），则改变后的 W 和 V1 和 T 需代入公式重新计算。

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 藜芦醇所需的酶量为一个酶活力单位（U）。

$$\text{LiP 活性}(\text{nmol/min/mg prot}) = [\Delta A \div (\epsilon \times d) \times V2 \times 10^9] \div (V1 \times \text{Cpr}) \div T = 215.1 \times \Delta A \div \text{Cpr}$$

2. 按照样本质量计算：

酶活定义：每克样品每分钟氧化 1nmol 藜芦醇所需的酶量为一个酶活力单位（U）。

$$\text{LiP 活性}(\text{nmol/min/g 鲜重}) = [\Delta A \div (\epsilon \times d) \times V2 \times 10^9] \div (W \times V1 \div V) \div T = 215.1 \times \Delta A \div W$$

3. 按照细胞数量计算：

酶活定义：每 10⁴ 个细胞每分钟氧化 1nmol 藜芦醇所需的酶量为一个酶活力单位（U）。

$$\begin{aligned} \text{LiP 活性}(\text{nmol/min/10}^4 \text{ cell}) &= [\Delta A \div (\epsilon \times d) \times V2 \times 10^9] \div (\text{细胞数量} \times V1 \div V) \div T \\ &= 215.1 \times \Delta A \div \text{细胞数量} \end{aligned}$$

4. 按照液体体积计算：

酶活定义：每毫升培养液每分钟氧化 1nmol 藜芦醇所需的酶量为一个酶活力单位（U）。

$$\text{LiP 活性}(\text{nmol/min/mL}) = [\Delta A \div (\epsilon \times d) \times V2 \times 10^9] \div V1 \div T = 215.1 \times \Delta A$$

ϵ ---藜芦醛摩尔消光系数：9300L/mol/cm； d---比色皿光径，1cm；

V---加入提取液体积，1mL；

V1---反应中样本体积，0.08mL；

V2---反应总体积，0.8mL=8×10⁻⁴；

W---样本质量，g；

T---反应时间，5min

Cpr---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。