

上海茁彩生物科技有限公司
Shanghai zcibio technology Co.,Ltd.



生化检测原理示意图

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

紫外分光光度法

注意：正式测定之前选择2-3个预期差异大的样本做预测定。

试剂的组成和配制：

种类	试剂规格	储存条件	使用方法及注意事项
试剂一	液体80mL×1 瓶	4℃保存	-
试剂二	液体10mL×1 瓶	4℃避光保存	-
试剂三	液体5mL×1 瓶	4℃保存	-

产品说明：

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。

木质素过氧化物酶氧化藜芦醇生成藜芦醛，在310nm 处有特征吸收峰。

自备实验用品及仪器：

天平、研钵、低温离心机、紫外分光光度计、1 mL 石英比色皿。

操作步骤：

一、酶液提取

1. 组织：按照质量 (g) : 试剂一体积 (mL) 为1: 5~10 的比例 (建议称取约0.1g, 加入1mL 试剂一) 加入试剂一，冰浴匀浆后于4℃, 10000g 离心10min, 取上清置于冰上待测。
2. 细胞：按照细胞数量 (10⁴ 个) : 试剂一体积 (mL) 为500~1000: 1 的比例 (建议500 万细胞加入1mL 试剂一), 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. 培养液或其它液体：直接检测。

二、测定操作

	测定管
试剂一 (mL)	0.6
试剂二 (mL)	0.2
样品 (mL)	0.1
试剂三 (mL)	0.1

充分混匀，于1mL 石英比色皿，蒸馏水调零，测定310nm 处10s 和310s吸光值，记为A1 和A2， $\Delta A = A2 - A1$

三、酶活计算公式

1. 按照蛋白浓度计算

酶活性定义：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。

$$\text{LiP 活性 (nmol/min /mg prot)} = \Delta A \div (\varepsilon \times d) \times V_{\text{反总}} \div (V_{\text{样}} \times \text{Cpr}) \div T = 215 \times \Delta A \div \text{Cpr}$$

2. 按照样本质量计算

酶活性定义：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。

$$\text{LiP 活性 (nmol/min /g)} = \Delta A \div (\varepsilon \times d) \times V_{\text{反总}} \div (V_{\text{样}} \times W \div V_{\text{样总}}) \div T = 215 \times \Delta A \div W$$

3. 按照细胞数量计算

酶活性定义：每 10^4 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。

$$\begin{aligned} \text{LiP 活性 (nmol/min /}10^4 \text{ cell)} &= \Delta A \div (\varepsilon \times d) \times V_{\text{反总}} \div (V_{\text{样}} \times \text{细胞数量} \div V_{\text{样总}}) \div T \\ &= 215 \times \Delta A \div \text{细胞数量} \end{aligned}$$

4. 按照液体体积计算

酶活性定义：每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。

$$\text{LiP 活性 (nmol/min /L)} = \Delta A \div (\varepsilon \times d) \times V_{\text{反总}} \div V_{\text{样}} \div T = 2.15 \times 10^5 \times \Delta A$$

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，1mL； $V_{\text{样}}$ ：反应中样本体积，0.1mL； $V_{\text{样总}}$ ：加入提取液体积，1mL；Cpr：样本蛋白浓度，mg/mL；W：样本质量，g；T：反应时间，5min。