

上海茁彩生物科技有限公司
ZCIBIO Technology Co., Ltd



生化检测原理示意图

Cat. NO: ZC-S0466

Size: 100T/96S

漆酶检测试剂盒说明书

微量法

*正式测定前务必取 2-3 个预期差异较大的样本做预测定

一、测定意义:

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。

二、测定原理:

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。

三、需自备的仪器和用品:

可见分光光度计/酶标仪、低温离心机、微量玻璃比色皿/96 孔板、可调式移液枪、天平、研钵/匀浆器、冰和蒸馏水, 水浴锅。

四、试剂的组成和配置:

种类	试剂规格	储存条件	使用方法及注意事项
提取液	液体 110mL×1 瓶	4°C 保存	
试剂一	液体 20mL×1 瓶	4°C 保存	
试剂二	粉剂×2 瓶	4°C 避光保存	

五、操作步骤：

● 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 (10⁴ 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

● 测定步骤：

- (1) 分光光度计/酶标仪预热 30min 以上，调节波长至 420nm，分光光度计蒸馏水调零。
- (2) 水浴锅温度调至 45℃。
- (3) 工作液的配制：一瓶试剂二用 10mL 试剂一溶解。现用现配。
- (4) 操作表：在微量玻璃比色皿/96 孔板中分别加入下列试剂：

样本名称	测定管	空白管
样本 (μL)	30	
蒸馏水 (μL)	-	30
工作液 (μL)	170	170

在微量玻璃比色皿/96 孔板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 (酶标仪有控温功能的可以将温度调至 45℃) 拿出迅速擦干测定 190s 时的吸光值 A2，计算 $\Delta A_{\text{测定管}} = A2_{\text{测定}} - A1_{\text{测定}}$ ， $\Delta A_{\text{空白管}} = A2_{\text{空白}} - A1_{\text{空白}}$ ， $\Delta A = \Delta A_{\text{测定管}} - \Delta A_{\text{空白管}}$ 。空白管只需做一次。

六、漆酶活性计算

1. 按微量玻璃比色皿计算：

● 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力单位。

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

● 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

$$\text{漆酶酶活 (U/g 鲜重)} = \Delta A \div \epsilon \div d \times V_{\text{反总}} \times 10^9 \div (V_{\text{样}} \times W \div V_{\text{样总}}) \div T = 61.7 \times \Delta A \div W$$

● 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。

$$\begin{aligned} \text{漆酶酶活 (U/} 10^4 \text{ cell)} &= \Delta A \div \epsilon \div d \times V_{\text{反总}} \times 10^9 \div (V_{\text{样}} \times 500 \div V_{\text{样总}}) \div T \\ &= 0.123 \times \Delta A \end{aligned}$$

● 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。

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

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, 2×10^{-4} L; $V_{\text{样}}$: 反应中样本体积, 0.03mL; $V_{\text{样总}}$: 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。

2. 按96孔板计算：

将上述计算公式中的 d=1cm 换为 d=0.6cm (96孔板光径) 进行计算即可。

七、注意事项：

1. 工作液需临用前配制，并且尽快使用，4℃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。
3. 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。