

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-S0744

Size: 50T/48S

## 漆酶检测试剂盒说明书

### 可见分光光度法

\*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、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。

#### 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 60mL × 1 瓶	4°C 保存	
试剂一	液体 50mL × 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°C 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°C, 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°C。

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°C 水浴 3min，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力单位。

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

## (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。

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

## (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。

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

$$= 0.123 \times \Delta A$$

## (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。

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

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

## 七、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。
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。