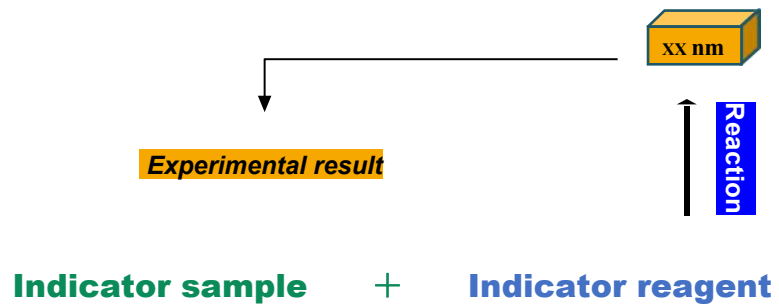


上海茁彩生物科技有限公司
Shanghai zcibio technology Co., Ltd.



生化检测原理示意图

漆酶检测试剂盒说明书

可见分光光度法

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。

产品内容：

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℃保存	-
试剂一	液体 50mL×1 瓶	4℃保存	-
试剂二	粉剂×2 瓶	4℃避光保存	-

产品说明：

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。

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。

试验中所需的仪器和试剂：

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。

操作步骤：

一、粗酶液提取：

a. 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。

b. 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℃，10000g 离心 10min，取上清置于冰上待测。

c. 培养液：直接检测。

二、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℃。

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。

三、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。

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

(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。

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

(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。

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

(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。

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, 0.001L; $V_{\text{样}}$: 反应中样本体积, 0.15mL; $V_{\text{样总}}$: 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。

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