

漆酶（Laccase）试剂盒说明书

微量法 100T/48S

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。

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，广泛分布于真菌和高等植物中，具有较强的氧化还原能力，在纸浆生物漂白，环境污染物降解和木质纤维素降解以及生物检测方面有非常广泛的应用。

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。

自备实验用品及仪器：

天平、低温离心机、可见分光光度计/酶标仪、微量石英比色皿/96 孔板、恒温水浴锅。

试剂组成和配制：

提取液：液体 100mL×1 瓶，4℃ 保存。

试剂一：液体 30mL×1 瓶，4℃ 保存。

工作液：粉剂×1 瓶，4℃ 避光保存，临用前加 15mL 试剂一溶解；用不完的试剂 4℃ 保存一周。

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。12000g 4℃ 离心 30min，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℃，10000g 离心 10min，取上清置于冰上待测。
3. 细胞培养液：直接检测。

测定操作表：

	对照管	测定管
样本（ μL ）	45	45
试剂一（ μL ）	255	
工作液（ μL ）		255
60℃ 水浴 20min 后冷却至室温，取 200 μL 反应液于微量石英比色皿/96 孔板中测定 420nm 处吸光值 A， $\Delta A = A_{\text{测定管}} - A_{\text{对照管}}$		

注意:

- 1、极少数样本在 60℃水浴 20min 后会出现沉淀，可经过 8000g 25℃离心 10min 后，取上清检测，例如成熟的水稻叶片样本。
- 2、为确保检测准确性，若 ΔA 大于 1，将样本用提取液稀释 2~10 倍后重新检测，计算公式乘以相应稀释倍数。

酶活性计算公式:

a. 用微量石英比色皿测定的计算公式如下

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 底物 ABTS 所需的酶量为一个酶活力单位。

$$\text{漆酶活性 (nmol/min /mg prot)} = \frac{\Delta A}{\varepsilon \times d} \times V_{\text{反总}} \div (V_{\text{样}} \times C_{\text{pr}}) \div T = 9.26 \times \Delta A \div C_{\text{pr}}$$

2. 按照样本质量计算

酶活性定义: 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。

$$\text{漆酶活性 (nmol/min /g 鲜重)} = \frac{\Delta A}{\varepsilon \times d} \times V_{\text{反总}} \div (V_{\text{样}} \times W \div V_{\text{样总}}) \div T = 9.26 \times \Delta A \div W$$

3. 按照细胞数量计算

酶活性定义: 每 10⁴ 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。

$$\text{漆酶活性 (nmol/min /10}^4 \text{ cell)} = \frac{\Delta A}{\varepsilon \times d} \times V_{\text{反总}} \div (V_{\text{样}} \times \text{细胞数量} \div V_{\text{样总}}) \div T = 9.26 \times \Delta A \div \text{细胞数量}$$

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 底物 ABTS 所需的酶量为一个酶活力单位。

$$\text{漆酶活性 (nmol/min /L)} = \frac{\Delta A}{\varepsilon \times d} \times V_{\text{反总}} \div V_{\text{样}} \div T = 9260 \times \Delta A$$

ε: ABTS 毫摩尔消光系数: 36L/mmol/cm; d: 比色皿光径, 1cm; V 反总: 反应总体积, 0.3mL; V 样: 反应体系中样本体积, 0.03mL; V 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, 20min

b. 用 96 孔板测定的计算公式如下

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 底物 ABTS 所需的酶量为一个酶活力单位。

$$\text{漆酶活性 (nmol/min /mg prot)} = \frac{\Delta A}{\varepsilon \times d} \times V_{\text{反总}} \div (V_{\text{样}} \times C_{\text{pr}}) \div T = 18.52 \times \Delta A \div C_{\text{pr}}$$

2. 按照样本质量计算

酶活性定义: 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。

$$\text{漆酶活性 (nmol/min /g 鲜重)} = \frac{\Delta A}{\varepsilon \times d} \times V_{\text{反总}} \div (V_{\text{样}} \times W \div V_{\text{样总}}) \div T = 18.52 \times \Delta A \div W$$

3. 按照细胞数量计算

酶活性定义: 每 10⁴ 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。

$$\begin{aligned} \text{漆酶活性 (nmol/min /10}^4 \text{ cell)} &= \frac{\Delta A}{\varepsilon \times d} \times V_{\text{反总}} \div (V_{\text{样}} \times \text{细胞数量} \div V_{\text{样总}}) \div T \\ &= 18.52 \times \Delta A \div \text{细胞数量} \end{aligned}$$

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 底物 ABTS 所需的酶量为一个酶活力单位。

$$\text{漆酶活性 (nmol/min/L)} = \frac{\Delta A}{\epsilon \times d} \times V_{\text{反总}} \div V_{\text{样}} \div T = 18520 \times \Delta A$$

ϵ : ABTS 毫摩尔消光系数: 36L/mmol/cm; d : 比色皿光径, 0.5cm; $V_{\text{反总}}$: 反应总体积, 0.3mL; $V_{\text{样}}$: 反应中样本体积, 0.045mL; $V_{\text{样总}}$: 加入提取液体积, 1mL; C_{pr} : 样本蛋白浓度, mg/mL; W , 样本质量, g; T : 反应时间, 20min