

漆酶活性检测试剂盒（微量法）

产品货号：BA1257

产品规格：100管/96样

产品简介：

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。

注意：实验之前建议选择2-3个预期差异大的样本做预实验。如果样本吸光值不在测量范围内建议稀释或者增加样本量进行检测。

产品组成：

试剂名称	规格	保存条件
提取液	液体110mL×1瓶	4℃
试剂一	液体20mL×1瓶	4℃
试剂二	粉剂×2瓶	4℃

溶液的配制：

1. 工作液的配制：一瓶试剂二用10mL试剂一溶解。现用现配。

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

操作步骤：

一、样本处理（可适当调整待测样本量，具体比例可以参考文献）

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（ 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. 培养液：直接检测。

二、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. 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（ μ L）	30	-
蒸馏水（ μ L）	-	30
工作液（ μ L）	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，拿出迅速擦干测定190s时的吸光值A2，计算 ΔA 测定管=A2 测



扫一扫 加微信

郑州乐业生物科技有限公司

Zhengzhou Leye-Bio Biotechnology Co., Ltd

地址：郑州市高新区红松路36号龙鼎企业中心一期1号楼5楼25号

免费电话：400-611-0007 13671551480 13643719799

QQ：807961520 731791866

邮箱：zzlybio@126.com

定-A1 测定, ΔA 空白管=A2 空白-A1 空白, $\Delta A=\Delta A$ 测定管- ΔA 空白管。(空白管只需做 1-2 次)

三、漆酶活性计算

1. 按微量玻璃比色皿:

(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) = $\Delta A \div (\epsilon \times d) \times V_{\text{反总}} \times 10^9 \div (V_{\text{样}} \times C_{\text{pr}}) \div T = 61.7 \times \Delta A \div C_{\text{pr}}$

(2) 按样本质量计算

酶活定义: 每克样本每分钟氧化 1nmol 底物 ABTS 所需的酶量为一个酶活力单位。

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

(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) = $\Delta A \div (\epsilon \times d) \times V_{\text{反总}} \times 10^9 \div (V_{\text{样}} \times 500 \div V_{\text{样总}}) \div T = 0.123 \times \Delta A$

(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) = $\Delta A \div (\epsilon \times d) \times V_{\text{反总}} \times 10^9 \div V_{\text{样}} \div T = 61.7 \times \Delta A$

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; 500: 细胞总数, 500 万; 10^9 : 单位换算系数, $1\text{mol}=10^9\text{nmol}$ 。

2. 按 96 孔板计算:

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

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, 请将样本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。

实验实例:

1. 取 0.1g 香菇加 1mL 提取液进行样本处理, 取上清后按照测定步骤操作, 用微量玻璃比色皿测得计算 ΔA 测定管=A2 测定-A1 测定=0.8963-0.1004=0.7959, ΔA 空白管=A2 空白-A1 空白=0.0729-0.0542=0.0187, $\Delta A=\Delta A$ 测定管- ΔA 空白管=0.7959-0.0187=0.7772, 按样本质量计算酶活得:
漆酶酶活 (U/g 质量) = $61.7 \times \Delta A \div W = 61.7 \times 0.7772 \div 0.1 = 479.53$ U/g 质量。



扫一扫 加微信

郑州乐业生物科技有限公司

Zhengzhou Leye-Bio Biotechnology Co., Ltd

地址: 郑州市高新区红松路36号龙鼎企业中心一期1号楼5楼25号

免费电话: 400-611-0007 13671551480 13643719799

Q Q: 807961520 731791866

邮箱: zzlybio@126.com