

漆酶活性检测试剂盒说明书

可见分光光度法

货号: BC1630

规格: 50T/48S

产品组成: 使用前请认真核对试剂体积与瓶内体积是否一致, 有疑问请及时联系索莱宝工作人员。

试剂名称	规格	保存条件
提取液	液体 60 mL×1 瓶	4℃保存
试剂一	液体 50 mL×1 瓶	4℃保存
试剂二	粉剂×2 瓶	4℃保存

溶液的配制:

1. 工作液的配制: 一瓶试剂二用 25 mL 试剂一溶解。现用现配。

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。

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。

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

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、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 ΔA 测定管=A2 测定-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) = $\Delta A \div (\epsilon \times d) \times V_{\text{反总}} \times 10^9 \div (V_{\text{样}} \times C_{\text{pr}}) \div T = 61.7 \times \Delta A \div C_{\text{pr}}$

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 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。

漆酶酶活 (U/10⁴ 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, 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; 500: 细胞总数, 500 万; 10⁹: 单位换算系数, 1mol=10⁹nmol。

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, 测得计算 ΔA 测定管=A2 测定-A1 测定=0.657-0.084=0.573, ΔA 空白管=A2 空白-A1 空白=0.087-0.058=0.029, $\Delta A=\Delta A$ 测定管- ΔA 空白管=0.573-0.029=0.544, 按样本质量计算酶活得:

漆酶酶活 (U/g 质量) = $61.7 \times \Delta A \div W = 61.7 \times 0.544 \div 0.1 = 335.648$ U/g 质量。

相关系列产品:

BC0200/BC0205 过氧化氢酶 (CAT) 活性检测试剂盒

BC0090/BC0095 过氧化物酶 (POD) 活性检测试剂盒