

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°C保存。

试剂一：液体30mL×1瓶，4°C保存。

工作液：粉剂×1瓶，4°C避光保存，临用前加15mL试剂一溶解；用不完的试剂4°C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°C离心30min，取上清，置冰上待测。
2. 细胞：按照细胞数量（10⁴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. 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°C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°C水浴20min后会出现沉淀，可经过8000g 25°C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。

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

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。

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

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。

$$\text{漆酶活性 (nmol/min /104 cell)} = \frac{\square \times V_{\text{反总}}}{(V_{\text{样}} \times \text{细胞数量} \div V_{\text{样总}}) \div T} = 9.26 \times \Delta A \div \text{细胞数量}$$

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。

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

ϵ : ABTS毫摩尔消光系数: 36L/mmol/cm; d : 比色皿光径, 1cm; $V_{\text{反总}}$: 反应总体积, 0.3mL; $V_{\text{样}}$: 反应体系中样本体积, 0.03mL; $V_{\text{样总}}$: 加入提取液体积, 1mL; C_{pr} : 样本蛋白浓度, mg/mL; 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。

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

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。

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

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。

$$\begin{aligned} \text{漆酶活性 (nmol/min /104 cell)} &= \boxed{} \times V_{\text{反总}} \div (V_{\text{样}} \times \text{细胞数量} \div V_{\text{样总}}) \div T \\ &= 18.52 \times \Delta A \div \text{细胞数量} \end{aligned}$$

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。

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

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