

木质素过氧化物酶（Lignin peroxidase, Lip）试剂盒说明书

微量法100T/96S

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

木质素过氧化物酶（EC1.11.1.14）是一种含亚铁血红素的过氧化物酶，属于木质素降解酶系，在木质素生物降解、造纸工业、纺织工业、芳香化合物转化与降解及环境污染控制等方面具有较大的应用潜力。

测定原理

木质素过氧化物酶催化天青脱甲基，在651nm处测定吸光值减少。

自备实验用品及仪器

天平、研钵、低温离心机、酶标仪、96孔板、可调式移液器、冰。

试剂组成和配制

试剂一：粉剂×1瓶，4℃保存。临用前加入115mL蒸馏水，充分溶解待用，用不完的试剂4℃保存一个月。

试剂二：液体5mL×1瓶，4℃避光保存。

试剂三：液体5mL×1支，4℃保存。

酶液提取

1. 组织：按照质量（g）：试剂一体积（mL）为1：5~10的比例（建议称取约0.1g，加入1mL试剂一）加入试剂一，冰浴匀浆后于4℃，10000g离心10min，取上清置于冰上待测。
2. 细胞：按照细胞数量（10⁴个）：试剂一体积（mL）为500~1000：1的比例（建议500万细胞加入1mL试剂一），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. 培养液或其它液体：直接检测。

测定操作

- 1、酶标仪预热30min以上，调节波长至651nm。
- 2、临用前按每个样本试剂一：试剂二：试剂三=80:40:40（ μ L）的比例配制工作液，现配现用。
- 3、在96孔板中依次加入如下试剂

	测定管
样品（ μ L）	40
工作液（ μ L）	160
充分混匀，立即测定651nm处10s和130s吸光值，记为A1和A2， $\Delta A=A1-A2$	

酶活计算公式

1. 按照蛋白浓度计算

酶活性定义：每mg组织蛋白在每mL反应体系中每分钟A651变化0.01为一个酶活力单位。

$$\text{LiP活性 (U/mg prot)} = \Delta A \times V_{\text{反总}} \div (V_{\text{样}} \times \text{Cpr}) \div 0.01 \div T = 250 \times \Delta A \div \text{Cpr}$$

2. 按照样本质量计算

酶活性定义：每g组织在每mL反应体系中每分钟A651变化0.01为一个酶活力单位。

$$\text{LiP活性 (U/g 鲜重)} = \Delta A \times V_{\text{反总}} \div (W \times V_{\text{样}} \div V_{\text{样总}}) \div 0.01 \div T = 250 \times \Delta A \div W$$

3. 按照细胞数量计算

酶活性定义：每1万个细菌或细胞在每mL反应体系中每分钟A651变化0.01为一个酶活力单位。

$$\text{LiP活性 (U/104 cell)} = \Delta A \times V_{\text{反总}} \div (500 \times V_{\text{样}} \div V_{\text{样总}}) \div 0.01 \div T = 0.5 \times \Delta A$$

4. 按照液体体积计算

酶活性定义：每mL血清（浆）在每mL反应体系中每分钟A651变化0.01为一个酶活力单位。

$$\text{LiP活性 (U/mL)} = \Delta A \times V_{\text{反总}} \div V_{\text{样}} \div 0.01 \div T = 250 \times \Delta A$$

V反总：反应总体积，0.2mL；V样：反应中样本体积，0.04mL；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，2min