

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

(货号: G1005F 紫外分光法 48 样)

一、产品简介:

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。

木质素过氧化物酶 (LiP) 氧化藜芦醇生成藜芦醛, 藜芦醛在 310nm 处有特征吸收峰。通过测定 310nm 处的藜芦醛的增加速率, 即可得到木质素过氧化物酶 (LiP) 酶活性大小。

二、试剂盒组分与配制:

试剂名称	规格	保存要求	备注
提取液	液体 120mL×1 瓶	4°C 保存	
试剂一	一 A: 液体 μL ×1 支 一 B: 空瓶×1 瓶	4°C 保存	临用前甩几下 EP 管 (一 A) 使液体落入底部, 再向 EP 管中加入 0.5mL 蒸馏水混匀溶解, 全部转移至空瓶 B 中, 再向 EP 管中加入 0.5mL 蒸馏水涮洗后全部转移至 B 瓶中 (可分别再用 0.5mL 蒸馏水涮洗 EP 管 2 次), 最后再加 7mL 蒸馏水混匀后做为试剂一待用 (总体积为 9mL); 用不完的试剂 4°C 保存。
试剂二	液体 μL ×1 支	4°C 保存	临用前甩几下使液体落入底部, 取 2 个新的 EP 管, 每管取 3.3 μL 液体, 再加 2mL 蒸馏水混匀备用。

三、所需的仪器和用品:

紫外分光光度计、1mL 石英比色皿 (光径 1cm)、天平、研钵、低温离心机、水浴锅、可调式移液器。

四、木质素过氧化物酶 (Lip) 活性测定:

建议正式实验前选取 2 个样本做预测定, 了解本批样品情况, 熟悉实验流程, 避免实验样本和试剂浪费!

1、样本制备:

① 组织样本:

取约 0.1g 组织 (水分充足的样本可取 0.5g), 加入 1mL 提取液, 进行冰浴匀浆。4°C×12000rpm 离心 10min, 取上清, 置冰上待测。

【注意】 若样本颜色较深 (如植物叶片), 可引起起始值 A1 值较大如超过 1.5, 可在样本制备过程中增加除色素步骤: 取约 0.1g 组织 (水分充足的样本可取 1g), 加入 80%乙醇冰浴匀浆, 12000rpm, 4°C离心 10min, 弃掉色素较深的上清液; 以上除色素步骤重复 2 次。最后向离心得到的沉淀中加入 1mL 提取液, 混匀或再次冰浴匀浆, 12000rpm, 4°C离心 10min, 取上清置冰上待测。

② 细菌或培养细胞:

先收集细菌或细胞到离心管内, 离心后弃上清; 取约 500 万细菌或细胞加入 1mL 提取液, 超声波破碎细菌或细胞 (功率 300w, 超声 3 秒, 间隔 7 秒, 总时间 3min); 4°C×12000rpm 离心 10min, 取上清, 置冰上待测。

【注】: 若增加样本量, 可按照数量 (10^4): 提取液体积 (mL) 为 500-1000: 1 的比例进行提取

- ③ 液体样本：若是澄清液体，直接检测，若液体样本浑浊，需 4°C×12000rpm，离心 10min，取上清液检测。

2、上机检测：

- ① 紫外分光光度计预热 30min 以上，调节波长至 310nm，蒸馏水调零。
 ② 所有试剂至常温状态（25°C）或水浴锅孵育 10-15min。
 ③ 在 1mL 石英比色皿（光径 1cm）中依次加入：

试剂名称（μL）	测定管
提取液	480
样本上清液	80
试剂一	160
试剂二	80
充分混匀，30°C条件下，10s 时于 310nm 处读取 A1，5min 后再读取 A2， $\Delta A=A2-A1$ 。	

【注】：若 ΔA 在零附近，可增加取样质量 W（如增至 0.2g 或更多），或增加样本加样体积 V1（如增至 200μL 或更多，则加样体系中提取液相应减少），或延长反应时间 T（由 5min 增加至 10min 或更长），则改变后的 W 和 V1 和 T 需代入公式重新计算。

五、结果计算：

1. 按照蛋白浓度计算：

酶活定义：每毫克蛋白每分钟氧化 1nmol 藜芦醇所需的酶量为一个酶活力单位（U）。

$$\text{LiP 活性}(\text{nmol}/\text{min}/\text{mg prot}) = [\Delta A \div (\epsilon \times d) \times V2 \times 10^9] \div (V1 \times \text{Cpr}) \div T = 215.1 \times \Delta A \div \text{Cpr}$$

2. 按照样本质量计算：

酶活定义：每克样品每分钟氧化 1nmol 藜芦醇所需的酶量为一个酶活力单位（U）。

$$\text{LiP 活性}(\text{nmol}/\text{min}/\text{g 鲜重}) = [\Delta A \div (\epsilon \times d) \times V2 \times 10^9] \div (W \times V1 \div V) \div T = 215.1 \times \Delta A \div W$$

3. 按照细胞数量计算：

酶活定义：每 10⁴ 个细胞每分钟氧化 1nmol 藜芦醇所需的酶量为一个酶活力单位（U）。

$$\begin{aligned} \text{LiP 活性}(\text{nmol}/\text{min}/10^4 \text{ cell}) &= [\Delta A \div (\epsilon \times d) \times V2 \times 10^9] \div (\text{细胞数量} \times V1 \div V) \div T \\ &= 215.1 \times \Delta A \div \text{细胞数量} \end{aligned}$$

4. 按照液体体积计算：

酶活定义：每毫升培养液每分钟氧化 1nmol 藜芦醇所需的酶量为一个酶活力单位（U）。

$$\text{LiP 活性}(\text{nmol}/\text{min}/\text{mL}) = [\Delta A \div (\epsilon \times d) \times V2 \times 10^9] \div V1 \div T = 215.1 \times \Delta A$$

ϵ ---藜芦醛摩尔消光系数：9300L/mol/cm； d---比色皿光径，1cm；

V---加入提取液体积，1mL；

V1---反应中样本体积，0.08mL；

V2---反应总体积，0.8mL=8×10⁻⁴；

W---样本质量，g；

T---反应时间，5min

Cpr---样本蛋白浓度，mg/mL；建议使用本公司的 BCA 蛋白含量检测试剂盒。