



漆酶活性检测试剂盒

Laccase Activity Assay Kit



北京盒子生工科技有限公司
Beijing Boxbio Science & Technology Co., Ltd.



漆酶活性检测试剂盒

Laccase Activity Assay Kit

一、产品描述

漆酶是一种含铜多酚氧化酶,属于铜蓝氧化酶家族,能够与多酚类和芳香二胺类等多种底物作用,其独特的催化性质在木质素降解、生物检测、制浆造纸生物漂白、环境保护、有机合成、食品及饮料加工等领域具有广泛应用。

漆酶能够催化 ABTS 生成 ABTS 自由基,产物在 420 nm 处具有特征吸收峰,通过吸光值变化速率即可表征漆酶的活性。

二、产品内容

名称	试剂规格	储存条件	使用方法及注意事项
提取液	液体 120 mL×1 瓶	4°C保存	-
试剂一	液体 20 mL×1 瓶	4°C保存	-
试剂二	粉剂×2 瓶	4°C避光保存	使用前每瓶加入 10 mL 试剂一充分溶解 (配制后 4°C可保存一周,若变色则停止使用)

三、产品使用说明

测定过程中所需要的仪器和试剂: 可见分光光度计/酶标仪、微量玻璃比色皿(光径 10 mm)/96 孔板、研钵/匀浆器、台式离心机、可调式移液器/多道移液器、恒温水浴/培养箱和蒸馏水。

1.粗酶液的制备(可根据预实验结果适当调整样本量及比例)

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 0.1 g 组织,加入 1 mL 提取液)处理样品,冰浴匀浆,4°C 10000 g 离心 10 min,取上清置于冰上待测。

②细菌或细胞:离心收集细菌或细胞至离心管内,按照细菌或细胞数量(10^4 个):提取液体积(mL)为(500-1000):1 的比例(建议 500 万细菌或细胞加入 1 mL 提取液)处理样品,冰浴超声破碎(功率 300 W,超声 3 s,间隔 7 s,总时间 3 min),4°C 10000 g 离心 10 min,取上清置于冰上待测。

③培养液等液体样本:直接测定或适当稀释后再进行测定。

2.测定步骤

①分光光度计或酶标仪预热 30 min 以上，调节波长至 420 nm，蒸馏水调零。

②在 96 孔板或微量玻璃比色皿中依次加入下列试剂：

试剂	测定组 (μL)	空白组 (μL)
粗酶液	30	-
蒸馏水	-	30
试剂二	170	170

吸光值测定：①充分混匀并立即开始计时，测定 10 s（总时间）时 420 nm 处吸光值，记为 A1 测定和 A1 空白；②45°C 准确反应 180 s，测定 190 s（总时间）时 420 nm 处吸光值，记为 A2 测定和 A2 空白；③计算 $\Delta A_{\text{测定}} = A2_{\text{测定}} - A1_{\text{测定}}$ ， $\Delta A_{\text{空白}} = A2_{\text{空白}} - A1_{\text{空白}}$ ， $\Delta A = \Delta A_{\text{测定}} - \Delta A_{\text{空白}}$ 。注：空白组只需测定 1-2 次。

3.漆酶（Laccase）活性计算

3.1 使用 96 孔板测定的计算公式

①按组织蛋白浓度计算

单位定义：每 mg 组织蛋白每分钟氧化 1 nmol ABTS 所需酶量定义为一个酶活力单位。

$$\text{Laccase (U/mg prot)} = \frac{\Delta A \times V_{\text{反总}} \times 10^9}{\epsilon \times d_1 \times \text{Cpr} \times V_{\text{样}} \times T} = \frac{123.46 \times \Delta A}{\text{Cpr}}$$

②按组织样本质量计算

单位定义：每 g 组织样本每分钟氧化 1 nmol ABTS 所需酶量定义为一个酶活力单位。

$$\text{Laccase (U/g)} = \frac{\Delta A \times V_{\text{反总}} \times V_{\text{样总}} \times 10^9}{\epsilon \times d_1 \times W \times V_{\text{样}} \times T} = \frac{123.46 \times \Delta A}{W}$$

③按细菌或细胞数量计算

单位定义：每 10^4 个细菌或细胞每分钟氧化 1 nmol ABTS 所需酶量定义为一个酶活力单位。

$$\text{Laccase (U/10}^4 \text{ cell)} = \frac{\Delta A \times V_{\text{反总}} \times V_{\text{样总}} \times 10^9}{\epsilon \times d_1 \times \text{细菌或细胞数量} \times V_{\text{样}} \times T} = \frac{123.46 \times \Delta A}{\text{细菌或细胞数量}}$$

④按液体样本体积计算

单位定义：每 mL 液体样本每分钟氧化 1 nmol ABTS 所需酶量定义为一个酶活力单位。

$$\text{Laccase (U/mL)} = \frac{\Delta A \times V_{\text{反总}} \times 10^9}{\epsilon \times d_1 \times V_{\text{样}} \times T} = 123.46 \times \Delta A$$

3.2 使用微量玻璃比色皿测定的计算公式

①按组织蛋白浓度计算

单位定义：每 mg 组织蛋白每分钟氧化 1 nmol ABTS 所需酶量定义为一个酶活力单位。

$$\text{Laccase (U/mg prot)} = \frac{\Delta A \times V_{\text{反总}} \times 10^9}{\epsilon \times d_2 \times \text{Cpr} \times V_{\text{样}} \times T} = \frac{61.73 \times \Delta A}{\text{Cpr}}$$

②按组织样本质量计算

单位定义：每 g 组织样本每分钟氧化 1 nmol ABTS 所需酶量定义为一个酶活力单位。

$$\text{Laccase (U/g)} = \frac{\Delta A \times V_{\text{反总}} \times V_{\text{样总}} \times 10^9}{\epsilon \times d_2 \times W \times V_{\text{样}} \times T} = \frac{61.73 \times \Delta A}{W}$$

③按细菌或细胞数量计算

单位定义：每 10^4 个细菌或细胞每分钟氧化 1 nmol ABTS 所需酶量定义为一个酶活力单位。

$$\text{Laccase (U}/10^4 \text{ cell)} = \frac{\Delta A \times V_{\text{反总}} \times V_{\text{样总}} \times 10^9}{\epsilon \times d_2 \times \text{细菌或细胞数量} \times V_{\text{样}} \times T} = \frac{61.73 \times \Delta A}{\text{细菌或细胞数量}}$$

④按液体样本体积计算

单位定义：每 mL 液体样本每分钟氧化 1 nmol ABTS 所需酶量定义为一个酶活力单位。

$$\text{Laccase (U/mL)} = \frac{\Delta A \times V_{\text{反总}} \times 10^9}{\epsilon \times d_2 \times V_{\text{样}} \times T} = 61.73 \times \Delta A$$

注释： V 样：反应体系中加入粗酶液的体积，0.03 mL；V 反总：反应体系总体积， 2×10^{-4} L；V 样总：粗酶液总体积，1 mL； ϵ ：ABTS 摩尔消光系数， 3.6×10^4 L/mol/cm； d_1 ：96 孔板光径，0.5 cm； d_2 ：微量玻璃比色皿光径，1 cm；Cpr：样本蛋白浓度，mg/mL；W：样本质量，g；细菌或细胞数量：以万计；T：反应时间，3 min； 10^9 ：单位换算系数， $1 \text{ mol} = 10^9 \text{ nmol}$ 。

四、注意事项

- ①若 A2 测定大于 1.0，建议将粗酶液使用提取液适当稀释后再进行测定，计算时相应修改；
- ②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；
- ③准确在 10 s 和 190 s 完成吸光值测定，以确保实验结果的准确性和重复性；若使用 96 孔板测定应使用多道移液器且分批测定，以确保组间反应时间一致；
- ④为保证结果准确且避免试剂损失，测定前请仔细阅读说明书（以实际收到说明书内容为准），确认试剂储存和准备是否充分，操作步骤是否清楚，且务必取 2-3 个预期差异较大的样本进行预测定，过程中问题请您及时与工作人员联系。

For Research Use Only. Not for Use in Diagnostic Procedures.

